



Elaboration et caractérisation d'agents de contraste IRM pour le ciblage des intégrines $\alpha v \beta 3$.

Julie Bolley

► To cite this version:

Julie Bolley. Elaboration et caractérisation d'agents de contraste IRM pour le ciblage des intégrines $\alpha v \beta 3$.. Imagerie médicale. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2014. Français. NNT : 2014PA132012 . tel-01233853

HAL Id: tel-01233853

<https://theses.hal.science/tel-01233853>

Submitted on 25 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur d'Université

Discipline : **Chimie**

Présentée et soutenue publiquement par

Julie Bolley

Le 29 janvier 2014

Elaboration et caractérisation d'agents de contraste IRM pour le ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$

Directrice de thèse : Pr L. Motte, Université Paris 13

Directeur de thèse : Pr M. Lecouvey, Université Paris 13

Devant le jury composé de :

Mme Sylvie Bégin-Colin
M. Daniel Scherman
Mme Claire Wilhelm
M. Marc Lecouvey
Mme Laurence Motte

Rapporteur
Examineur
Rapporteur
Directeur de thèse
Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu ma directrice de thèse, Mme Laurence Motte, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je lui suis également reconnaissante pour m'avoir encouragée et conseillée tout au long de ces années ainsi que pour sa franchise et sa sympathie. Mes remerciements s'adressent conjointement à mon directeur de thèse, M. Marc Lecouvey.

Je remercie sincèrement M. Daniel Scherman, Mme Sylvie Bégin-Colin, Mme Claire Wilhelm pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je souhaite exprimer ma gratitude à l'ensemble des personnes impliquées dans ce projet. Merci à Nathalie pour sa disponibilité, sa sympathie et ses conseils notamment lors des séances de TP. Merci à Joëlle et à Sabrina pour leur aide. Merci à Oualid pour son expertise concernant les manipulations BIAcore. J'aimerais adresser un remerciement particulier à Steven et Julie qui ont eu la générosité d'effectuer mes analyses IRM pendant leurs gardes. Merci à Carole, Yanne, Armelle et Dala pour m'avoir gentiment accueilli et fait une place dans leur laboratoire pendant les expériences de radioactivité. Je remercie également Sébastien, Françoise, Marianne, Gisèle, Johanne, Nathalie, Bich-Thuy, Grégory, Véronique et Clément pour avoir rendu possible et pour m'avoir fait découvrir les expériences *in vitro* et *in vivo*.

J'adresse de très chaleureux remerciements à l'ensemble de l'équipe « Nano » du laboratoire LBPS pour leur soutien et leur sympathie. Je tiens à remercier en particulier Yoann et Erwann pour leur disponibilité, leur aide précieuse et leurs conseils avisés. Un grand merci également à Irena et Sophie avec qui j'ai partagé de très bons moments.

Une pensée aux doctorants avec qui j'ai partagé ces trois années de thèse, en particulier Souad, Succounda, Caroline, Margery.

Je remercie Fred pour son amitié et son soutien quotidien.

Mes plus sincères remerciements s'adressent à Emilie et Maël dont la profonde amitié et le soutien n'ont jamais failli. Un très grand merci à vous pour tous les excellents moments passés en votre compagnie.

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour leur soutien et leur confiance depuis tant d'années et sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui.

Sommaire

Introduction générale.....	11
----------------------------	----

Chapitre 1 : L'intégrine $\alpha_v\beta_3$: une cible pertinente pour une détection précoce de l'angiogenèse

I. L'angiogenèse	17
II. Les intégrines	20
II. 1. Généralités	20
II. 2. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$	22
III. Ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$: les peptides de type RGD et peptidomimétiques.....	24
IV. Les différents systèmes de vectorisation et détection	26
IV. 1. Les techniques d'imagerie	28
IV. 2. Les systèmes de vectorisation	31
IV. 2. 1. Les CPPs (Cell Penetrating Peptides).....	31
IV. 2. 2. Les liposomes	32
IV. 2. 3. Les systèmes polymériques	35
IV. 2. 4. Les nanoparticules inorganiques	39
IV. 2. 5. Le ciblage des intégrines dans l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires	46
V. Stratégie de couplages - Réactions de bioconjugaison.....	47
V. 1. Chimie des carbodiimides	49
V. 2. La « click chemistry ».....	50
V. 2. 1. La réaction de cycloaddition de Huisgen	50
V. 2. 2. La réaction thiol-yne.....	52
V. 3. Apport des micro-ondes	52
Références bibliographiques	56

Chapitre 2 : Fonctionnalisation de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ pour le ciblage et l'imagerie de l'angiogenèse

I. Synthèse, fonctionnalisation de la surface et caractérisation des nanoparticules de maghémite	61
I. 1. Synthèse des nanoparticules $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ en système micellaire direct.....	61
I. 2. Fonctionnalisation des nanoparticules $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	63
I. 3. Caractérisations physico-chimiques de la nanoplateforme	64
I. 3. 1. Evaluation de la taille par MET.....	65
I. 3. 2. Spectroscopie infrarouge	65
I. 3. 3. Propriétés hydrodynamiques	66
I. 3. 4. Etude du comportement magnétique	67
I. 3. 5. IRM.....	69
I. 3. 6. Quantification des ligands adsorbés	70
II. Elaboration de nanoplateformes multimodales	70
II. 1. Protocole de couplage	71
II. 2. Nanoplateformes bimodales IRM/fluorescence.....	72
II. 2. 1. Choix du fluorophore.....	72
II. 2. 2. Apport des micro-ondes.....	73
II. 3. Nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA-PEG}$	77
II. 3. 1. Caractérisation de l'état de surface et quantification du nombre de molécules PEG.....	78
II. 3. 2. Propriétés hydrodynamiques et magnétiques	81
II. 4. Nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA-RGD}$ et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA-(PEG-RGD)}$	83
II. 5. Elaboration des nanoplateformes multimodales superparamagnétiques	85
III. Evaluation des nanoplateformes synthétisées en tant qu'agent de contraste IRM.....	88
IV. Evaluation de la stabilité en milieu biologique	88
V. Affinité des nanoplateformes vis-à-vis des intégrines	89
V. 1. Etude par SPR (BIAcore).....	90

V. 2.	Etude par dosage de liaison en présence d'un compétiteur	92
VI.	Vers les peptidomimétiques	95
	Références Bibliographiques.....	99

Chapitre 3 : Fonctionnalisation des nanoparticules par Chimie des Carbodiimides et Chimie click : Etude comparative

I.	Les bisphosphonates.....	103
II.	Synthèse, fonctionnalisation de la surface et caractérisation des nanoparticules.....	105
II. 1.	Synthèse et fonctionnalisation de surface	105
II. 2.	Caractérisation	105
II. 3.	Quantification des ligands adsorbés.....	110
III.	Comparaison du couplage par chimie des carbodiimides et chimie click.....	111
III. 1.	Protocoles de couplage	112
III. 2.	Couplages de fluorophores.....	114
III. 3.	Couplages de chaînes PEG	119
III. 4.	Couplages de peptides RGD	122
III. 5.	Elaboration de nanoplateformes multimodales.....	124
IV.	Comparaison de la stabilité en milieu biologique	126
V.	Evaluation des nanoplateformes synthétisées en tant qu'agent de contraste IRM.....	126
VI.	Affinité des nanoplateformes vis-à-vis des intégrines	127
VI. 1.	Comparaison des nanoplateformes obtenues par chimie des carbodiimides et chimie click	127
VI. 2.	Etude de la longueur de la chaîne PEG.....	129
	Références Bibliographiques.....	131

Chapitre 4 : Influence de la taille, de la forme, de la méthode de synthèse sur les propriétés des nanoparticules d'oxyde de fer

I.	Synthèse des nanoparticules.....	135
----	----------------------------------	-----

I. 1.	Synthèse des nanoparticules de forme sphérique par voie sol-gel	135
I. 2.	Synthèse des nanoparticules de forme allongée	136
I. 3.	Fonctionnalisation de surface	136
II.	Caractérisations physico-chimiques	136
II. 1.	Détermination de la taille par MET	136
II. 2.	Propriétés hydrodynamiques.....	139
II. 3.	Etat de surface et étude qualitative de la structure cristalline par spectroscopie infrarouge	140
II. 3. 1.	Etat de surface	140
II. 3. 2.	Interprétation qualitative de la phase cristalline	141
II. 3. 3.	Quantification du nombre de ligand	143
III.	Propriétés magnétiques	144
III. 1.	Courbes d'aimantation et ZFC-FC.....	145
III. 2.	Etude IRM.....	152
IV.	Couplage motif RGD	153
	Références Bibliographiques.....	157

Chapitre 5 : Evaluation biologique et approche théranostique

I.	Evaluation biologique	161
I. 1.	Ciblage des tumeurs.....	161
I. 1. 1.	Ciblage de glioblastomes <i>in vitro</i>	161
I. 1. 2.	Ciblage du carcinome du colon	165
I. 2.	Ciblage de l'athérosclérose.....	170
II.	Vers un agent de contraste théranostique	171
II. 1.	Les thapsigargines.....	171
II. 2.	Elaboration d'une nanoplateforme théranostique	173
II. 3.	Résultats biologiques	175

II. 4. Vers une amélioration de la nanoplateforme cytotoxique	176
Références Bibliographiques.....	180
Conclusion générale et perspectives.....	181
Liste des publications et communications issues de ces travaux	185
Annexes	187

Introduction générale

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet ANR, programme Blanc, (2010-2013) : « Nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des bisphosphonates : une nanoplatforme IRM spécifique à la détection des intégrines surexprimées par les cellules tumorales ». Il réunit en partenariat le laboratoire de Synthèse et Structure de Molécules d'Intérêt Pharmacologique (Dr J. Perard, Université Paris 5, UMR8638), le laboratoire de Bio-ingénierie Cardiovasculaire pour la thérapie et l'imagerie médicale (Dr D. Letourneur, Université Paris 7, INSERM U698) et le laboratoire Chimie Structure et Propriétés des Biomatériaux et Agents Thérapeutiques (Université Paris 13, UMR 7244 CNRS). Cette thèse, financée par l'ANR, est intitulée « Elaboration et caractérisation d'agents de contraste IRM pour le ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ » et a été réalisée sous la direction conjointe du Pr. L. Motte et du Pr. M. Lecouvey (laboratoire CSPBAT).

En France, le cancer est la première cause de mortalité chez les hommes et la deuxième chez les femmes après les maladies cardiovasculaires. Améliorer de manière précoce et précise le diagnostic, et diminuer les effets secondaires grâce à une thérapie ciblée sont des enjeux fondamentaux pour faire reculer ces maladies. Ces avancées reposent notamment sur l'élaboration de vecteurs capables de déjouer les barrières biologiques afin d'acheminer de manière ciblée un agent d'imagerie et/ou un principe actif. La possibilité d'agir sur l'angiogenèse constitue une stratégie prometteuse. En effet, ce processus, impliquant la formation de nouveaux vaisseaux à partir du réseau préexistant, est connu pour être une étape critique aussi bien dans le développement tumoral que dans la croissance et la rupture de la plaque d'athérome, à l'origine de bon nombre de maladies cardiovasculaires. La migration et l'adhésion des cellules lors de la formation des vaisseaux nécessitent l'intervention de molécules d'adhésion, parmi lesquelles les intégrines $\alpha_v\beta_3$ jouent un rôle important. Elles se lient sélectivement aux peptides contenant la séquence Arg-Gly-Asp (RGD) ou à des molécules dérivées (peptidomimétiques). Elles apparaissent ainsi comme une cible pertinente pour la détection de ces pathologies.

L'objectif premier de ce travail concerne l'élaboration et l'optimisation d'une nanoplatforme à des fins d'imagerie capable de cibler ces intégrines. Le cœur est constitué par une nanoparticule d'oxyde de fer qui de part ses propriétés superparamagnétiques est utilisé en tant qu'agent de contraste IRM. L'habillage spécifique de la surface permet d'ajouter de nouvelles propriétés. Ainsi, des fluorophores, des peptides de types RGD ou

peptidomimétiques et des chaînes de polyéthylène glycol sont couplés sur la nanoplateforme pour, respectivement, donner accès à la double imagerie (fluorescence/IRM), cibler les intégrines, servir d'espaceur (entre la molécule à coupler et la nanoplateforme) et/ou jouer sur la furtivité.

Le premier chapitre revient sur le processus angiogénique et l'implication des intégrines $\alpha_v\beta_3$. Il présente l'intérêt de l'utilisation des systèmes de vectorisation et décrit les différents nanovecteurs utilisés pour cibler ces molécules lors de recherches biomédicales à des fins d'imagerie et/ou de thérapie. Nous verrons ainsi que ces systèmes ont été principalement étudiés pour le diagnostic et le traitement des cancers, mais qu'ils peuvent également montrer un intérêt pour le ciblage d'autres pathologies telles que l'athérosclérose. Une autre partie de ce chapitre sera consacrée aux stratégies de couplages, principalement celles employées au cours de ce travail (chimie des carbodiimides et chimie click). L'utilisation des micro-ondes est également discutée à travers des manipulations réalisées précédemment au sein du laboratoire.

Le second chapitre est consacré à la conception de nanoparticules d'oxyde de fer sphériques, obtenues par voie micellaire directe, fonctionnalisées en surface par un agent complexant de type cathécol, l'acide caféique (CA). Cette molécule présente des fonctions acides carboxyliques qui sont utilisées pour le couplage, par chimie des carbodiimides, des diverses molécules citées précédemment. Différentes techniques sont utilisées pour caractériser et quantifier l'état de surface de chaque nanoplateforme synthétisée. L'évaluation de la stabilité dans le sérum, leur potentiel en tant qu'agent de contraste IRM et leur affinité vis-à-vis des intégrines sont étudiés. Par ailleurs, en fin de chapitre, la reconnaissance des intégrines par des peptidomimétiques (synthétisés par l'UMR 8638) est estimée.

Dans le troisième chapitre, la chimie des carbodiimides et la « chimie click » sont comparées lors du couplage des diverses biomolécules. Pour cela, deux nouvelles nanoplateformes sont élaborées. Il s'agit de nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées en surface par des agents complexants de type bisphosphonates différant uniquement par leur fonction réactive terminale, acide carboxylique ou alcène.

Dans le but d'optimiser les propriétés d'agents de contraste IRM des nanoparticules d'oxyde de fer, une étude sur l'effet de taille et de forme est réalisée dans le chapitre 4. Pour cela, des nanoparticules sphériques de tailles différentes sont obtenues par voie sol-gel et des nanobâtonnets sont synthétisées. Toutes ces particules sont fonctionnalisées en surface par l'acide caféique. L'influence de la taille, de la méthode de synthèse et de la forme des particules sur les propriétés magnétiques sont discutées.

Dans un dernier chapitre, les premières évaluations *in vitro* et *in vivo* des nanoplateformes ainsi que les premiers résultats concernant l'élaboration d'une nanoplateforme théranostique sont présentés. Ces études biologiques ont donné lieu à de nouvelles collaborations : avec le CEA-Neurospin pour le ciblage *in vitro* de glioblastomes, l'UMR 8151 pour le ciblage *in vivo* de carcinomes du colon et l'UMR 5536 pour le ciblage *in vitro* des plaques d'athérome.

Chapitre 1

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$: une cible pertinente pour une détection précoce de l'angiogenèse

L'amélioration des diagnostics précoces et des thérapies au cours de la dernière décennie ont réduit les décès dus au cancer du sein, du colon et du poumon ; cependant le cancer reste la cause de décès la plus fréquente dans les sociétés développées. Par conséquent, malgré d'indéniables progrès, améliorer l'efficacité et réduire les effets secondaires des traitements par chimiothérapie des tumeurs solides restent de la plus haute importance. Les intégrines $\alpha_v\beta_3$, impliquées dans le processus angiogénique, apparaissent comme une cible pertinente pour la détection précoce des cancers. Elles présentent également un intérêt pour d'autres pathologies telles que l'athérosclérose, à l'origine de nombreuses maladies cardiovasculaires. Dans ce chapitre, après une brève description de ce processus, nous nous intéresserons plus particulièrement à ces molécules d'adhésion cellulaire ainsi qu'à leur ciblage par des motifs peptidiques de type Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD) ou par des peptidomimétiques. Nous verrons ensuite l'intérêt d'un système de vectorisation et présenterons les différents vecteurs utilisés pour le diagnostic et/ou la thérapie. Le ciblage de ces intégrines a largement et principalement été exploré pour le diagnostic et le traitement des tumeurs.

I. L'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus impliquant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Il s'agit d'un mécanisme indispensable et hautement contrôlé dans les conditions physiologiques, qui se produit normalement lors du développement embryonnaire ou de la cicatrisation. Mais c'est aussi un processus pathologique, impliqué dans la croissance des tumeurs cancéreuses, décrit pour la première fois en 1971 par Judah Folkman.¹ Quand une tumeur atteint approximativement 2-3 mm³, ses besoins en oxygène et en nutriments ainsi que l'élimination de ses déchets ne sont plus assurés par diffusion simple.² Un état d'hypoxie cellulaire commence, induisant la production de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau préexistant. Ce réseau sanguin, destiné uniquement à alimenter la masse tumorale permet le développement et la multiplication sans limite des cellules cancéreuses au détriment de l'organisme, Figure 1.

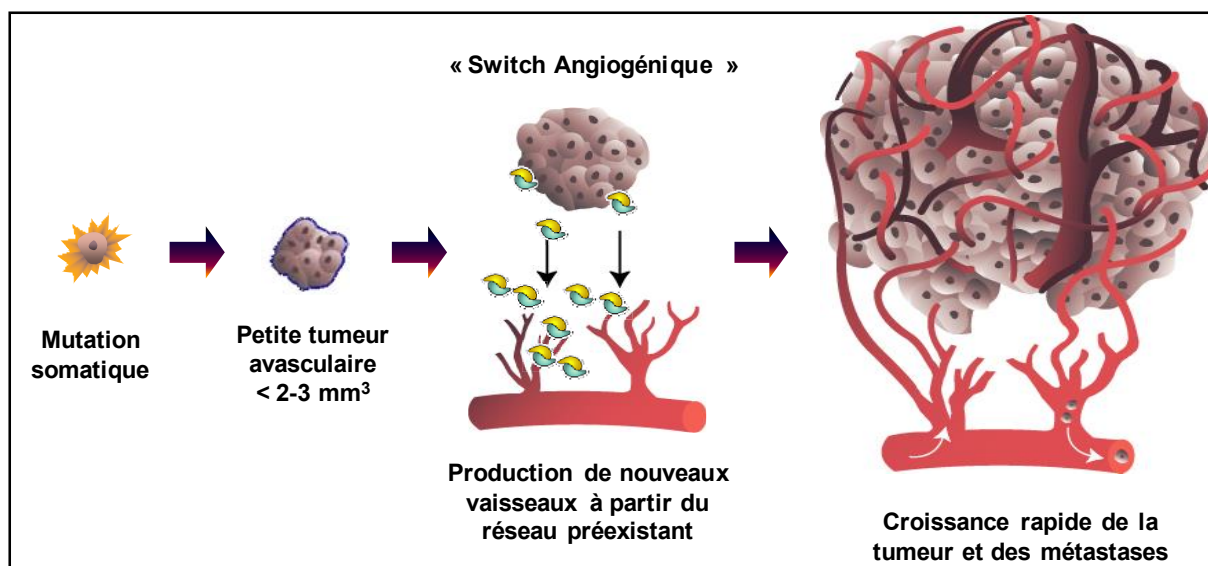


Figure 1 : L'angiogenèse

L'initiation de ce processus résulte de la dérégulation de l'équilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques, appelée « Switch angiogénique ». Elle résulte principalement : d'un stress métabolique (hypoxie, diminution du pH), d'un stress mécanique (pression exercée par la prolifération des cellules tumorales), d'un phénomène inflammatoire ou d'une mutation génétique.³ Les molécules pro-angiogéniques deviennent prédominantes et les inhibiteurs sont réprimés dans les cellules tumorales mais également dans le stroma tumoral. Ainsi, une augmentation des molécules pro-angiogéniques, principalement des facteurs de croissance tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le FGF (Fibroblast Growth Factor) ou le PDGF (Platelet-Derived Growth factor), ou d'un facteur nécrosant des tumeurs, le TNF α (Tumor Necrosis Factor α),⁴ est associée à une diminution d'inhibiteurs angiogéniques tels que la thrombospondine.⁵

Ce switch angiogénique entraîne une activation des cellules endothéliales à proximité de la tumeur, impliquant la surexpression de récepteurs protéiques de surface et de molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire telles que les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$. Parallèlement, les facteurs de croissance stimulent la sécrétion d'enzymes métalloprotéinases (MMPs) dégradant les protéines de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. Les cellules endothéliales migrent et conduisent à la formation de ramifications vasculaires, consolidées par le rattachement des péricytes, Figure 2.

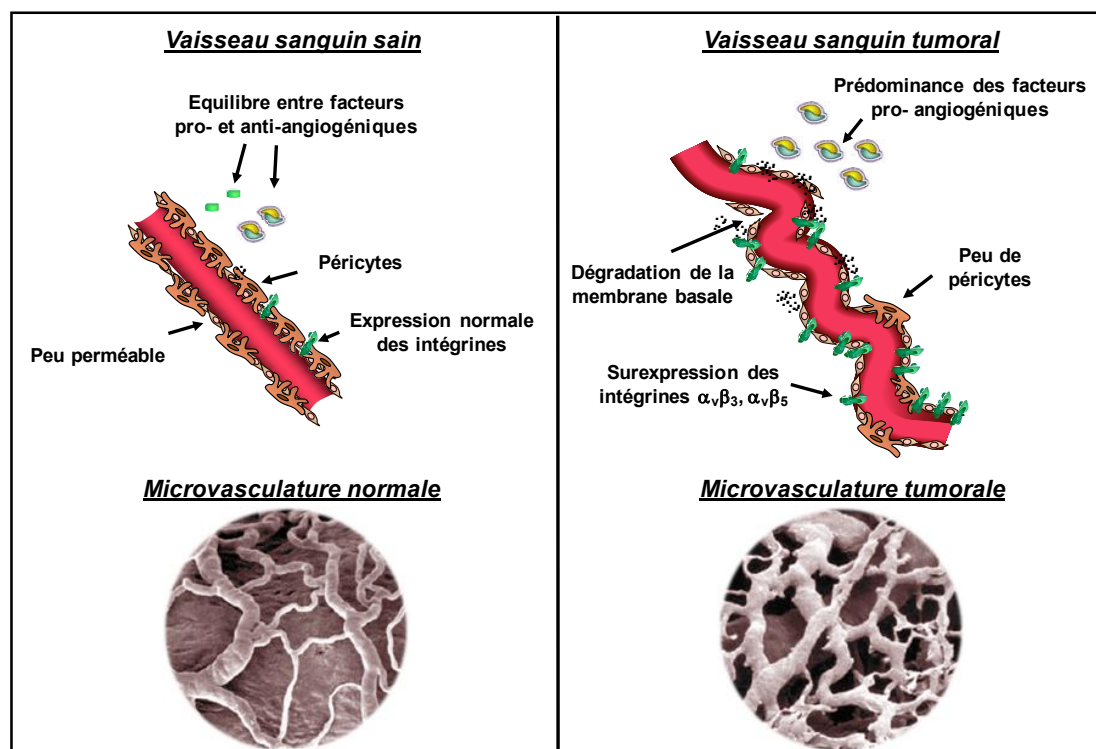


Figure 2 : Représentation des vaisseaux sanguins sains et tumoraux et des microvasculatures normales et tumorales⁶

Outre le processus tumoral, l'angiogenèse joue également un rôle dans d'autres pathologies de type cardiovasculaire. A l'origine de bon nombre de ces maladies, l'athérosclérose se caractérise par une accumulation de graisses dans la paroi artérielle principalement dans les artères de gros et moyen calibre. Une artère est composée de trois tuniques : l'interne ou l'intima, qui est directement en contact avec le sang ; le média ou tunique musculaire, qui est composée de fibres musculaires lisses permettant l'élasticité du vaisseau ; l'adventice ou tunique externe composée de tissu conjonctif, Figure 3. Les plaques d'athérome se forment au niveau de la couche interne des artères. Elles débutent par un simple dépôt de graisse puis peuvent évoluer et se charger en calcium, lipides, plaquettes ou autres cellules sanguines, entraînant une mauvaise circulation sanguine, et pouvant induire la formation d'un caillot sanguin (thrombose) obstruant de plus en plus le passage de la circulation sanguine. Le caillot peut se détacher et causer un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral. Les maladies ischémiques, définies comme la diminution de l'apport sanguin artériel à un organe (entraînant une baisse de l'oxygénation des tissus de l'organe en dessous de ses besoins et la perturbation voire l'arrêt de sa fonction), sont une autre conséquence de la formation de ces plaques. Les principaux facteurs de la genèse de l'athérosclérose sont les excès de cholestérol et de triglycérides, l'hypertension artérielle, l'obésité, le diabète le tabac ou le stress.

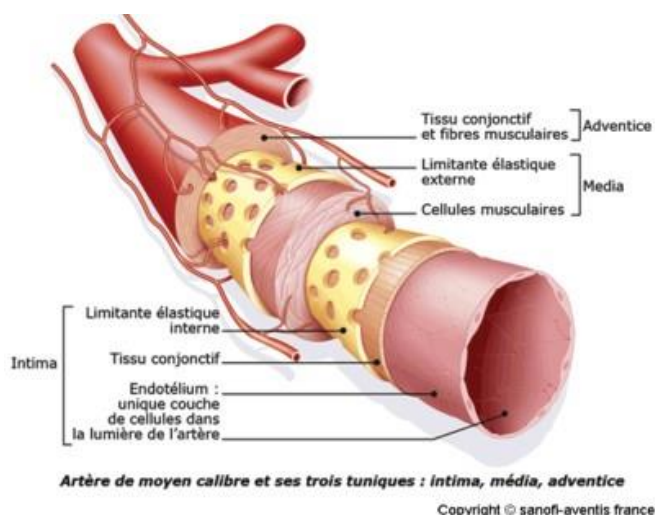


Figure 3 : Représentation schématique d'une artère (Sanofi-Aventis)

Différentes études ont suggéré que l'angiogenèse joue un rôle clé dans la croissance de la plaque et sa rupture. Dans les régions de lésions athérosclérotiques, les vaisseaux angiogéniques prolifèrent à partir du vasa vasorum (qui sont les petits vaisseaux de l'adventice des artères) pour fournir les demandes métaboliques nécessaires à la croissance de la plaque.

La migration et l'adhésion des cellules endothéliales sur la matrice extra-cellulaire pour la formation des néo-vaisseaux nécessitent l'intervention de molécules d'adhésion, parmi lesquelles les intégrines $\alpha_v\beta_3$ jouent un rôle important. Surexprimées par les cellules endothéliales néo-formées, elles sont ainsi une cible pertinente pour le ciblage de l'angiogenèse et donc pour le développement d'agents diagnostiques ou anti-cancéreux.

II. Les intégrines

II. 1. Généralités

Parmi les molécules d'adhésion cellulaire, les intégrines sont une famille importante de récepteurs cellulaires, impliqués dans les interactions cellules-cellules ou cellules-matrice extracellulaire.^{7,8} Il s'agit d'hétérodimères constitués de deux sous-unités glycoprotéiques transmembranaires α et β , associées de manière non covalente. Chez les mammifères, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β sont répertoriés et peuvent s'associer pour former 24 intégrines différentes⁷, Figure 4A. Trois domaines peuvent être différenciés : l'un extracellulaire (extrémité *N*-terminal), l'un transmembranaire et le dernier intracellulaire (en *C*-terminal), Figure 4B. La plus grande partie de la sous-unité α contient approximativement

1100 résidus et est souvent ramifiée au voisinage de la partie transmembranaire par l'établissement de ponts disulfures. La partie extracellulaire est caractérisée par 3 ou 4 régions, contenant 12 à 15 résidus capables de s'associer à des cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}). La sous-unité β , quant à elle, possède environ 800 résidus (excepté β_4 qui en contient 1750). Elle comporte également quatre domaines de 40 résidus, riches en cystéine, à proximité du domaine transmembranaire. La partie *N*-terminale, exposée vers le milieu extracellulaire, est repliée et forme une large boucle. Les chaînes α et β contiennent 20 à 30 résidus dans le domaine transmembranaire et 20 à 50 résidus dans la région intracellulaire.⁸

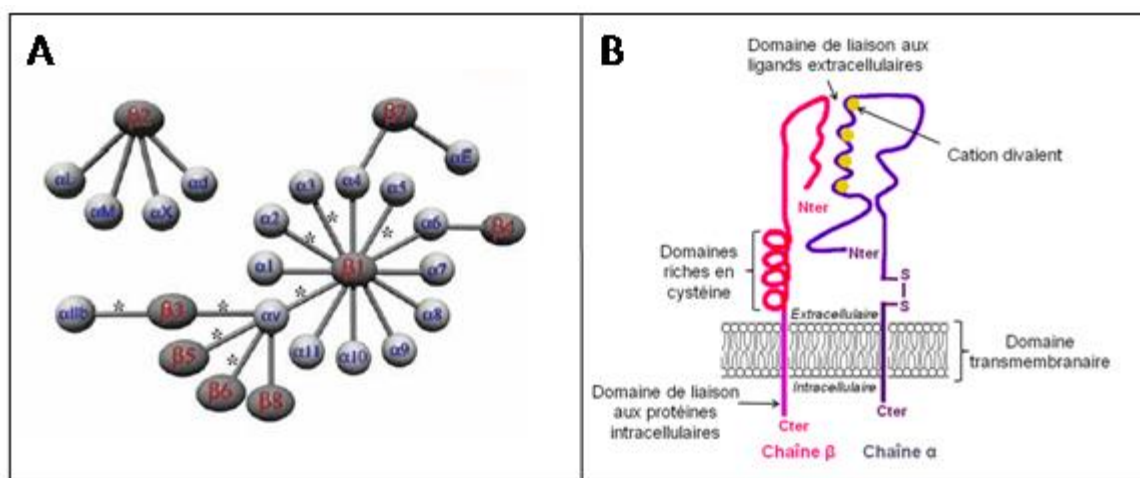


Figure 4 : A) Les différentes associations entre les sous unités α et β . Les intégrines se liant à leur substrat via le motif RGD sont indiquées par une * B) Représentation schématique d'une intégrine⁷

Les chaînes α et β jouent un rôle important dans l'adhésion des ligands de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, vitronectine,...) ou des récepteurs d'adhérence cellulaire. Ainsi, la plupart des intégrines peuvent s'associer à plusieurs ligands en reconnaissant des motifs de liaison structuralement divers avec des affinités variables. Elles jouent également un rôle dans la migration, la survie cellulaire, la prolifération, et la différenciation des cellules endothéliales.^{9,10} Elles sont impliquées dans la transduction des signaux entre la matrice extracellulaire et l'intérieur de la cellule. Des signaux mécaniques ou chimiques permettent la communication de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule ou inversement. Cette signalisation permet la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose, du pH intracellulaire, de la migration et de la force d'adhésion. Ces effets sont associés aux changements de conformation des intégrines dans la partie extracellulaire, qui varient suivant le type cellulaire, la nature du ligand et sont modulés par les cations divalents, nécessaires à l'interaction intégrine-ligand. Cependant les mécanismes de l'activation ou de la régulation des intégrines sont encore inconnus.^{11,12}

Les intégrines exprimées dans les cellules tumorales contribuent à la progression de la tumeur et aux métastases en augmentant la migration, l'invasion, la prolifération et la survie de ces cellules. Parmi les intégrines, $\alpha_v\beta_3$ est probablement celle qui participe le plus à la régulation de l'angiogenèse.¹³

II. 2. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$, connue en tant que récepteur de la vitronectine, est constitué d'une sous unité α_v (125 kDa) et d'une sous unité β_3 (105 kDa). Elle se lie à beaucoup d'autres molécules de la matrice extracellulaire présentant le motif RGD notamment la fibronectine, le fibrinogène, le facteur de Willeband, le collagène, l'ostéopontine. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a un rôle important dans la résorption des os, l'angiogenèse, la néovascularisation pathologique, et le développement des métastases des tumeurs.⁹

La description de la structure cristalline de la partie extra-cellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par diffraction des rayons X¹² a permis de mettre en évidence un équilibre entre différents états de conformation : l'un replié, l'autre déplié, Figure 5. La conformation repliée correspond à un état de faible affinité puisque le site de liaison n'est pas orienté de manière à favoriser la liaison des ligands de la matrice extracellulaire. Le déploiement de l'intégrine accompagné de l'éloignement des domaines cytoplasmiques augmente de manière radicale son affinité vis-à-vis de ses ligands. Il peut être induit par des événements intracellulaires (mutations dans le domaine cytoplasmique ou liaison de protéines effectrices par exemple), ou extracellulaires (liaison d'un ligand ou présence de cations Mn^{2+}).^{14,15} Cette extension expose le site de reconnaissance du RGD. L'association du ligand à l'intégrine se fait sur les deux sous-unités. L'arginine (R) interagit avec la chaîne α_v , l'acide aspartique (D) avec la chaîne β_3 et la glycine (G) est à l'interface, servant d'espaceur et aidant à la stabilité du complexe.¹⁶

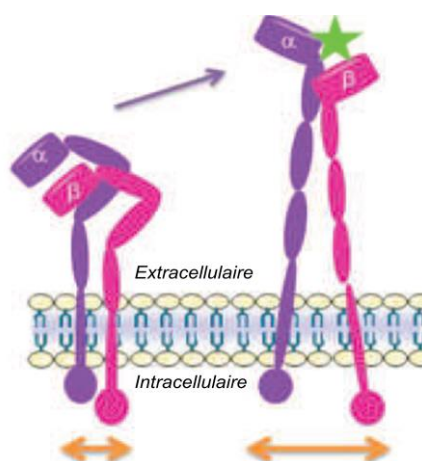


Figure 5: Conformations de l'intégrine. A gauche repliée et inactive, à droite, dépliée et active, elle expose le site de liaison RGD (étoile) ¹³

Parmi les différentes intégrines, $\alpha_v\beta_3$ a été la première à être associée à l'angiogenèse tumorale.¹⁷ Son expression par les cellules endothéliales est stimulée par les facteurs de croissance angiogéniques tels que le bFGF ou le TNF- α . Elle agit en coopération avec les récepteurs des facteurs de croissance en formant des complexes avec les récepteurs de l'insuline, du PDGF et du VEGF pour promouvoir la migration cellulaire. Son rôle principal consiste au recrutement et à l'activation des MMP-2 à la surface des vaisseaux sanguins, qui dégradent la membrane basale et génèrent de nouveaux sites d'adhésion nécessaires à la migration. L'intégrine protège également les cellules endothéliales de l'apoptose.¹³ Par ailleurs, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est beaucoup plus abondante dans les vaisseaux tumoraux que dans les vaisseaux des tissus normaux.

L'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans les cellules cancéreuses est ainsi corrélée à la progression de différents types de tumeurs, Tableau 1. Dans le cancer du sein, la surexpression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est associée à une augmentation des métastases et induit la croissance de la tumeur et son invasion, en réponse à l'ostéopontine. Dans les glioblastomes, elle engendre une meilleure mobilité cellulaire et une résistance à l'apoptose. Dans la tumeur pancréatique, sa surexpression est liée à une augmentation de l'activation des MMP-2 et à une hausse des métastases dans les ganglions lymphatiques.¹³

Type tumoral	Intégrines exprimées	Phénotypes associés
Mélanome	$\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$	Phase de croissance verticale et métastases dans les ganglions lymphatiques
Sein	$\alpha_6\beta_4$ et $\alpha_v\beta_3$	Augmentation de la taille et du grade de la tumeur et diminution de la survie ($\alpha_6\beta_4$). Augmentation des métastases osseuses ($\alpha_v\beta_3$)
Prostate	$\alpha_v\beta_3$	Augmentation des métastases osseuses
Pancréas	$\alpha_v\beta_3$	Métastases dans les ganglions lymphatiques
Ovaire	$\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$	Augmentation des métastases péritonéales ($\alpha_4\beta_1$) de la prolifération tumorale ($\alpha_v\beta_3$)
Col de l'utérus	$\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_6$	Diminution de la survie des patients
Glioblastome	$\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$	Les deux intégrines sont exprimées à la limite entre la tumeur et le tissu normal et joueraient un rôle dans l'invasion

Tableau 1 : Rôle des intégrines dans la progression tumorale¹⁸

III. Ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$: les peptides de type RGD et peptidomimétiques

La séquence RGD a été découverte dans le début des années 1970 par Ruoslahti, en tant que site d'attachement cellulaire de la fibronectine.¹⁹ Différentes intégrines ont la capacité de reconnaître le motif RGD notamment $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, Figure 4A. Cependant, ce sont les résidus adjacents et la conformation du peptide qui déterminent la spécificité et l'affinité des liaisons aux différentes intégrines.²⁰ La séquence RGD a été reconnue comme la séquence minimale requise pour la liaison de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec ses nombreux ligands naturels et est actuellement le modèle de base pour l'élaboration de molécules destinées à son ciblage. Les peptides linéaires RGD sont sujets à la dégradation chimique, et adoptent en solution différentes conformations, souvent liés à une faible sélectivité. C'est pourquoi de nombreux motifs dérivés du peptide RGD ont été synthétisés. Des peptidomimétiques ont ainsi été conçus pour imiter le peptide biologiquement actif (RGD) et présentent des différences structurales (incorporation d'acides aminés non naturels ou autres composés chimiques) permettant d'améliorer la reconnaissance des intégrines, en limitant la mobilité de conformation du peptide, et d'augmenter leur stabilité, en les rendant plus résistants vis-à-vis de la dégradation enzymatique.

Le criblage de séquence pentapeptidique contenant la séquence RGD a amené le groupe de Kessler à découvrir une première génération de peptides très active basée sur le c(RGDfV)^{21,22} (cyclique Arginine-Glycine-Acide Aspartique-D-Phénylalanine-Valine), dont l'analogue N-

alkylé : le c(RGDf-N(Me)-V) ou EMD121974 ou Cilengitide, Figure 6. D'autres structures de peptides ont été sélectionnées par « Criblage des Phages » telles que le RGD4C, et le RGD10.

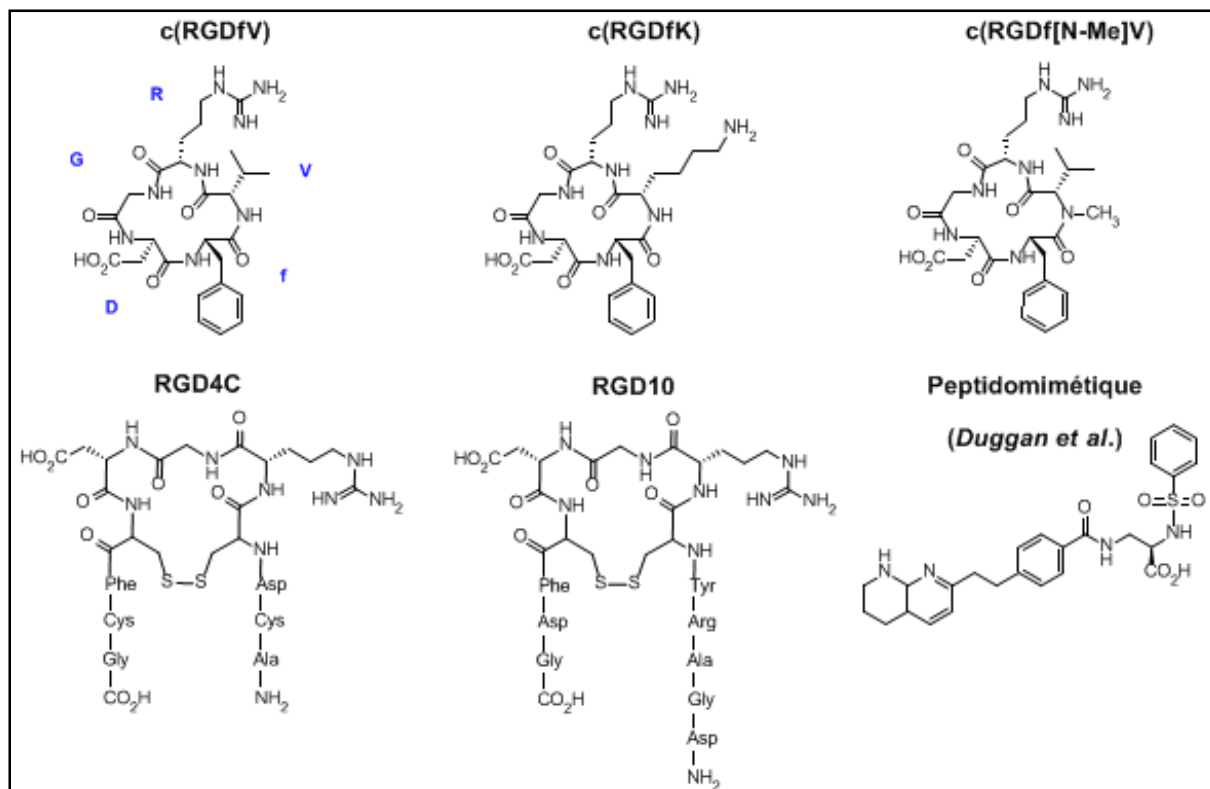


Figure 6 : Peptides cycliques du RGD et exemple de peptidomimétique²⁸

L'affinité des différents peptides vis-à-vis des intégrines $\alpha_v\beta_3$, a été déterminée par des tests de compétition avec la vitronectine ou le fibrinogène. Le c(RGDfV) présente une affinité de l'ordre du nanomolaire. Ce peptide cyclique est ainsi 100 à 1000 fois plus affiné que les peptides linéaires de référence. Ces résultats sont attribués à la structure rigide et à l'introduction de l'acide aminé non naturel (ici la phénylalanine: f), qui permet d'obtenir la conformation adéquate pour la liaison à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Il montre également une affinité 350 fois plus importante pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ que pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.²¹ Le remplacement de la valine par une lysine a montré peu d'influence sur l'activité biologique. Ainsi le c(RGDfK) est le pentapeptide le plus souvent utilisé pour la délivrance de molécules thérapeutiques. En effet, la fonction amine libre sur la lysine peut être utilisée pour des réactions de couplage.²³ Le Cilengitide, quant à lui, montre une affinité de l'ordre du subnanomolaire. Il présente ainsi une affinité 1000 fois plus importante pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ que pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.²⁴ Le Cilengitide a atteint la phase III des essais cliniques pour le traitement des glioblastomes, et la phase II pour d'autres types de cancer (les mélanomes ou le cancer de la prostate).

Le RGD4C est un peptide cyclique présentant deux liaisons disulfures et est 200 fois plus affin que les peptides linéaires.²⁵ Il a été exploité comme cible pour la délivrance de médicaments cytostatiques, et pour l'incorporation dans des protéines ou virus recombinants. L'inconvénient est que ce peptide peut former différentes structures cycliques, qui ont montré des affinités moindres.²⁶ Le RGD10, quant à lui, a seulement une liaison disulfure, et présente des propriétés similaires au RGD4C.²⁷ Pour le couplage chimique, le c(RGDfK) est préféré au cRGD4C pour sa plus grande stabilité et son aisance de couplage.

D'autres structures non peptidiques ont été décrites. La plupart de ces composés comportent un mime guanidine pour remplacer l'arginine et un acide carboxylique à la place de l'acide aspartique. Les deux principaux groupes sont reliés entre eux par une structure rigide et peuvent présenter une affinité en dessous du nanomolaire vis-à-vis de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Un exemple est présenté sur la Figure 6.²⁸ Peu de peptidomimétiques RGD ont été exploités pour le ciblage d'agents thérapeutiques ou diagnostiques, du fait du manque de groupes appropriés pour le couplage.

L'affinité ainsi que les propriétés pharmacocinétiques^{29,30} des ligands RGD peuvent être améliorés en les couplant à un système de vectorisation. Ce système peut permettre également de combiner sur une même plateforme d'autres fonctionnalités comme le transport ciblé d'agents thérapeutiques et des outils d'imagerie. Ainsi différents systèmes tels que les peptides, les polymères, les liposomes ou les nanoparticules, comportant plusieurs motifs RGD ont été étudiés.

IV. Les différents systèmes de vectorisation et détection

Un vecteur dit « idéal » doit présenter les propriétés suivantes :

- Biocompatible afin de ne présenter aucune toxicité pour l'organisme
- Biodégradable afin de ne pas s'accumuler dans l'organisme
- Furtif, c'est-à-dire qu'il doit présenter un temps de circulation assez long dans le sang et ne pas être éliminé (par les reins ou le foie par exemple) avant d'avoir atteint sa cible
- Spécifique du tissu ciblé

Afin de répondre à ces critères, différents vecteurs tels que les vecteurs peptidiques, les liposomes, les systèmes polymériques, les nanoparticules inorganiques, ont été développés. Ces nanovecteurs ont dû être modifiés notamment en surface afin d'améliorer leur comportement biologique. En effet, les nanovecteurs de première génération, permettant de véhiculer un principe actif, se retrouvent principalement au niveau des tissus du système réticulo-endothélial, c'est-à-dire principalement dans le foie. Ce phénomène est essentiellement dû au fait qu'ils présentent une surface spécifique considérable sur laquelle viennent s'adsorber de nombreuses protéines plasmatiques, en particulier les opsonines, qui seront reconnus par les macrophages du foie. Afin d'augmenter le temps de demi-vie plasmatique et de pouvoir atteindre la zone d'intérêt, la surface de ces vecteurs a été modifiée en introduisant des chaînes de polymères hydrophiles et flexibles, capables de repousser ces opsonines. Ces nanovecteurs de deuxième génération dits « furtifs » ne sont pas reconnus par le foie et ne vont pas s'y concentrer. Le PEG (*polyéthylène glycol*) est le polymère le plus couramment utilisé car il est biocompatible, soluble en milieu aqueux et faiblement immunogène. Ces particules PEGylées permettent une accumulation passive au niveau des zones d'angiogenèse par un effet dit EPR (*Enhanced Permeability and Retention*). Le mécanisme de rétention passive résultant de la vascularisation exacerbée de la tumeur est représenté Figure 7. Ceci entraîne une diminution du drainage lymphatique et rend les vaisseaux perméables aux macromolécules.

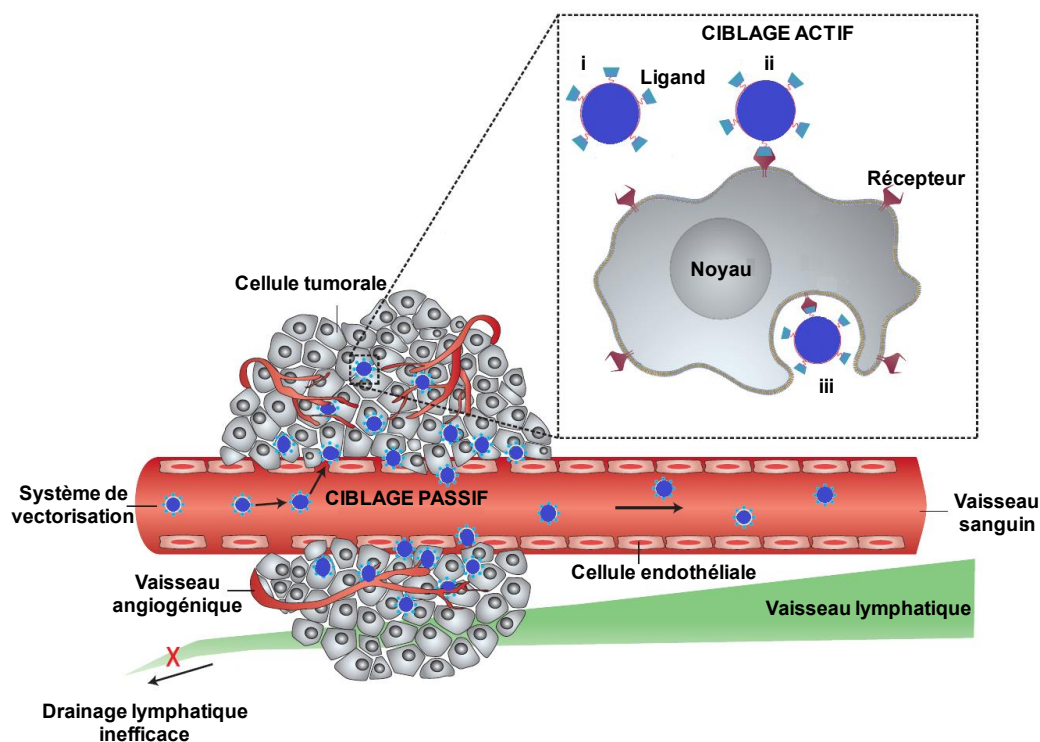


Figure 7 : Ciblage passif et actif ³¹

Par ailleurs, pour pouvoir cibler et pénétrer à l'intérieur de la cellule, des nanovecteurs de troisième génération ont été développés. Ils sont équipés de ligands qui vont être reconnus par des récepteurs situés sur les cellules d'intérêt. C'est le ciblage dit actif, Figure 7. Les deux ciblage sont complémentaires. Le ciblage actif s'ajoute au ciblage passif et permet d'augmenter la spécificité des objets. De plus, des systèmes multifonctionnels combinant le ciblage tumoral et des propriétés effectrices (théranostique) ont également été développés.

Afin d'être utilisables pour l'imagerie, ces différents vecteurs doivent présenter des propriétés intrinsèques particulières ou être couplés à des sondes, qui diffèrent en fonction de la technique de détection employée.

IV. 1. Les techniques d'imagerie

Différentes techniques d'imagerie sont couramment utilisées aussi bien pour des buts cliniques ou scientifiques et permettent d'acquérir des informations sur l'anatomie des organes (taille, volume, lésion) ou sur leur fonctionnement.³² Elles permettent de visualiser l'intérieur du corps, de manière non invasive, et ainsi de détecter les tissus pathologiques sans avoir recours à la chirurgie. Les principales techniques ainsi que leurs agents de contraste respectifs sont rappelées brièvement.

Le scanner (ou tomodensitométrie) repose sur l'utilisation des rayons X et permet d'obtenir des images tridimensionnelles des organes ou des tissus (os, muscles ou vaisseaux), grâce à la rotation du tube à rayons X autour du patient. Les capteurs entourant le patient permettent de mesurer l'absorption des différents tissus, qui diffèrent selon leur densité, et ainsi de visualiser une modification du volume ou une anomalie de structure. Les tissus peu denses, qui absorbent peu les rayons X, apparaissent alors en noir. Le contraste peut être amélioré en utilisant un produit à base d'iode.

La technique d'imagerie la plus connue employant les ultrasons est l'échographie. Une sonde est utilisée pour émettre et réceptionner les ultrasons. Des variations de propagation des ondes acoustiques à travers les différents tissus (des échos) sont ainsi mesurées. La fréquence des ultrasons (1 à 18 MHz généralement) varie selon l'application et la profondeur des tissus à imager. Plus elle sera élevée, plus l'image sera précise mais plus la pénétration tissulaire sera limitée. L'image restituée en temps réel permet de distinguer les différentes structures et d'explorer le cœur, les organes digestifs, urinaires ou génitaux. Ainsi les liquides sans suspension qui se contentent de laisser traverser les sons apparaîtront noirs, et les structures

solides (par exemple l'os), qui renvoient mieux les échos, apparaîtront blancs sur l'écran. Les microbulles peuvent être utilisées comme agents de contraste pour le système vasculaire.

La découverte de la radioactivité a conduit au développement de la médecine nucléaire avec la scintigraphie et tomographie par émission mono-photonique (SPECT - *Single-Photon Emission Computed Tomography*) puis la tomographie par émission de positrons (TEP). Ces techniques consistent à administrer une molécule couplée à un élément radioactif par voie intraveineuse afin de suivre son évolution dans l'organisme et ainsi réaliser une imagerie fonctionnelle. La SPECT utilise des isotopes émetteurs de rayonnements γ tels que le ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{111}In , ^{177}Lu . La détection se fait à l'aide de γ -caméras. La technique PET est conçue pour détecter indirectement les isotopes émetteurs de positon β^+ . Ce dernier va s'annihiler avec un électron du milieu après un temps de parcours de quelques millimètres. Cette annihilation produit deux photons γ de 511 keV, émis de façon synchrone dans des directions opposées. Une couronne de détecteur entourant le patient permet de détecter ces photons γ . Les émetteurs de positon utilisés sont le ^{11}C , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga .

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet de visualiser avec une grande précision les organes et tissus mous dans différents plans de l'espace. Cette technique repose principalement sur la relaxation des protons de l'eau, qui composent les tissus de l'organisme, en présence d'un champ magnétique externe. Le principe est détaillé en Annexe 1. Une antenne est utilisée pour capter les signaux émis qui sont ensuite transformés en images. Selon les processus de relaxation, longitudinal ou transversal, les agents de contraste sont classés en deux catégories, respectivement T1 ou T2. Les premiers génèrent un contraste positif, tels que les chélates de Gadolinium, les seconds un contraste négatif, tels que les nanoparticules d'oxyde de fer.

Le dernier groupe d'imagerie regroupe les techniques optiques, encore peu utilisées dans des applications cliniques. Parmi celles-ci, l'imagerie de fluorescence offre la possibilité d'un suivi spatio-temporel en temps réel de processus biologiques grâce à la détection de la lumière émise par un composé fluorescent en réponse à une excitation d'une longueur d'onde donnée. L'utilisation de la lumière proche IR permet la pénétration tissulaire de quelques centimètres, puisque c'est dans cette région que les différents constituants des tissus biologiques (hémoglobine, eau) absorbent le moins. Les agents de contraste utilisés incluent les Quantum Dots (QDs) et les molécules fluorescentes.

Chaque technique d'imagerie possède des avantages et des inconvénients, qui sont regroupés dans le Tableau 2.

Méthode	Avantages	Inconvénients	Agents de contraste
Scanner	<ul style="list-style-type: none"> · Pénétration tissulaire non limitée · Haute résolution spatiale · Imagerie du corps entier possible · Temps d'acquisition court (min) · Modérément coûteux · Imagerie anatomique 	<ul style="list-style-type: none"> · Exposition aux irradiations · Faible contraste des tissus mous 	<ul style="list-style-type: none"> · Barium · Iode · Krypton · Xenon
Ultrasons	<ul style="list-style-type: none"> · Irradiation non ionisante · Imagerie en temps réel / temps d'acquisition court (min) · Haute résolution spatiale · Utilisé de manière externe ou interne (endoscopie) · Peu coûteux · Très sensible 	<ul style="list-style-type: none"> · Pénétration tissulaire limitée (quelques cm) · Imagerie du corps entier n'est pas possible · Agents de contraste limités au système vasculaire 	<ul style="list-style-type: none"> · Microbulles
PET	<ul style="list-style-type: none"> · Pénétration tissulaire non limitée · Imagerie du corps entier possible · Très sensible 	<ul style="list-style-type: none"> · Exposition aux irradiations · Coûteux · Faible résolution spatiale (1-2 mm) · Temps d'acquisition longs (min-h) 	^{11}C ^{18}F ^{64}Cu ^{68}Ga
SPECT			$^{99\text{m}}\text{Tc}$ ^{123}I ^{111}In ^{177}Lu
IRM	<ul style="list-style-type: none"> · Pénétration tissulaire non limitée · Imagerie du corps entier possible · Irradiation non ionisante · Haute résolution spatiale · Excellent contraste des tissus mous 	<ul style="list-style-type: none"> · Coûteux · Temps d'acquisition longs (min-h) · Sensibilité limitée pour la détection des agents de contraste · Contre-indiqué chez les patients porteurs de dispositifs médicaux implantables actifs 	<ul style="list-style-type: none"> · Gadolinium (Gd^{3+}) · SPIO, USPIO · Oxyde de manganèse · ^{19}F
Optique	<ul style="list-style-type: none"> · Irradiation non ionisante · Imagerie en temps réel / Temps d'acquisition court (sec-min) · Résolution spatiale relativement élevée · Utilisé de manière externe ou interne (endoscopie) · Peu coûteux · Très sensible 	<ul style="list-style-type: none"> · Pénétration tissulaire limitée (quelques cm) · Imagerie du corps entier n'est pas possible 	<ul style="list-style-type: none"> · Molécules fluorescentes · QDs · NPs absorbant la lumière

Tableau 2 : Avantages et Inconvénients des techniques d'imagerie et leurs agents de contraste³⁵

Par exemple, l'IRM fournit des images avec résolution spatiale importante mais présente une faible sensibilité (10^{-3} à 10^{-5} M). Les imageries nucléaires, quant à elles, sont sensibles (10^{-8} à

10^{-9} M) mais moins résolues. L'imagerie proche infrarouge de fluorescence (10^{-9} , 10^{-12} M) est la plus sensible mais présente une faible pénétration tissulaire.³³ A l'heure actuelle, aucune technique d'imagerie n'est parfaite, il est alors intéressant de les associer, afin d'obtenir les informations désirées.³⁴ Ainsi, l'élaboration d'agents de contraste multimodaux est d'un intérêt majeur. Des exemples de systèmes de vectorisation, multimodaux ou non, concernant principalement l'imagerie de l'angiogenèse tumorale via la reconnaissance des intégrines $\alpha_v\beta_3$, et pouvant présenter des propriétés thérapeutiques, sont présentés ci-dessous.

IV. 2. Les systèmes de vectorisation

IV. 2. 1. Les CPPs (Cell Penetrating Peptides)

Des peptides ayant la propriété de traverser la membrane cellulaire ont été exploités pour vectoriser différents types de molécules cargo. Ces peptides, appelés CPP (Cell Penetrating Peptides) sont constitués de courtes séquences peptidiques d'environ 10 à 30 acides aminés.³⁶ Deux types de structure sont référencés : les peptides polycationiques qui contiennent des acides aminés chargés positivement tels que la lysine ou l'arginine et les peptides composés par une alternance d'acides aminés chargés et d'acides aminés hydrophobes. Ces séquences dérivent de protéines naturelles et sont d'origine biologique ou synthétique. Le couplage de la molécule d'intérêt sur ce vecteur peut se faire par couplage covalent ou par interactions non covalentes.

Les CPP constituent une stratégie intéressante puisqu'ils permettent une délivrance rapide des molécules à l'intérieur des cellules avec une grande efficacité, ils sont stables dans les tampons physiologiques et ne sont pas toxiques.³⁷ Cependant, leur dégradation métabolique, leur internalisation limitée à certains types cellulaires (dépendant notamment de la composition de la membrane) restent des freins à leur utilisation. De plus, la compréhension du mécanisme de capture cellulaire est toujours à l'étude et est sujet aux controverses.³⁶

Un CPP capable de cibler les intégrines $\alpha_v\beta_3$ *in vitro* et *in vivo* a été développé. Il s'agit d'un cyclodécapeptide c(KKKPGKAKPG), appelé RAFT (*Regioselectively Adressable Functionalized Template*).³⁸ Ce peptide cyclique est composé de deux domaines. Sur la partie supérieure sont couplés plusieurs peptides c(RGDfK) et la partie inférieure sert au couplage de biomolécules (agents de contraste ou agents cytotoxiques), Figure 8.

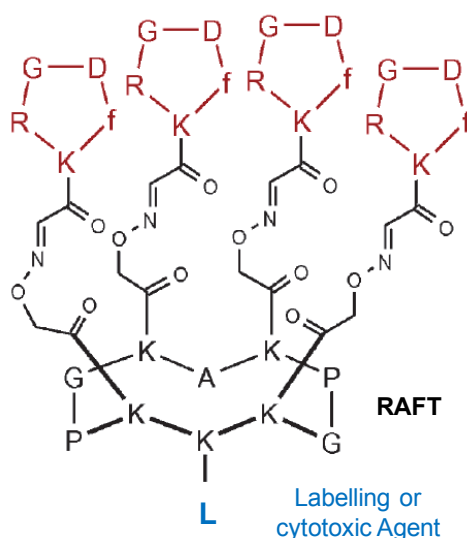


Figure 8: Structure chimique du RAFT, comportant 4 c(RGDfK) sur sa partie supérieure et conjugué à un agent de contraste ou cytotoxique sur sa partie inférieure

Un fluorophore (Cy5) a ainsi été couplé sur la surface inférieure afin d'imager la zone tumorale. Ce composé Cy5-RAFT-cRGD4 a montré une affinité dix fois plus importante pour les récepteurs de $\alpha_v\beta_3$ comparé au monomère cRGD, inhibant l'adhésion cellulaire à la vitronectine. De plus, il est rapidement internalisé dans les cellules par endocytose.³⁹ Par ailleurs, les expériences *in vivo* chez les souris nude révèlent que les injections intratumorales répétées réduisent la croissance de la tumeur.⁴⁰

L'imagerie par scintigraphie a également été utilisée pour visualiser *in vivo* les tumeurs surexprimant $\alpha_v\beta_3$. Le RAFT-cRGD a été couplé à différents radiotraceurs : le technécium 99 (^{99m}Tc) et l'indium 111 (^{111}In). Les deux composés ^{99m}Tc -RAFT-cRGD et ^{111}In -DOTA-RAFT-cRGD ont permis de visualiser les tumeurs par SPECT. Les expériences ont permis d'observer une accumulation tumorale du ^{99m}Tc -RAFT-cRGD beaucoup plus importante comparé au ^{99m}Tc -cRGD.⁴¹ Le composé ^{111}In -DOTA-RAFT-cRGD a montré une capture tumorale plus faible en comparaison avec le ^{99m}Tc -RAFT-cRGD, mais il a permis une rapide élimination sanguine.⁴²

IV. 2. 2. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules formées par des bicouches lipidiques concentriques, emprisonnant entre elles des compartiments aqueux. Ils sont préparés à partir d'une grande variété de lipides amphiphiles naturels ou synthétiques, dont les plus couramment utilisés sont les phospholipides. Ils ont une taille comprise entre 0,025 à 2,5 μm et permettent l'encapsulation de principes actifs hydrophiles dans leur compartiment aqueux ou

hydrophobes dans leur membrane, Figure 9. Les liposomes sont biocompatibles et sont une opportunité pour la délivrance de ces principes actifs à l'intérieur des cellules. Doté d'agent de contraste et de ligands de ciblage, ce sont des candidats intéressants pour l'imagerie de l'angiogenèse tumorale. Leur taille, leur charge et leurs propriétés de surfaces sont facilement changées par ajout de composants dans le mélange lipidique avant leur préparation ou par variation des méthodes de préparation. Ainsi, une génération de liposomes multimodaux possédant des temps de circulation relativement longs (LCL), des propriétés de ciblage (immunoliposomes) mais comportant également des agents de contraste a été développée. L'agent de contraste peut être incorporé soit dans la partie aqueuse du liposome soit dans sa bicouche lipidique ou adsorbé à sa surface.⁴³

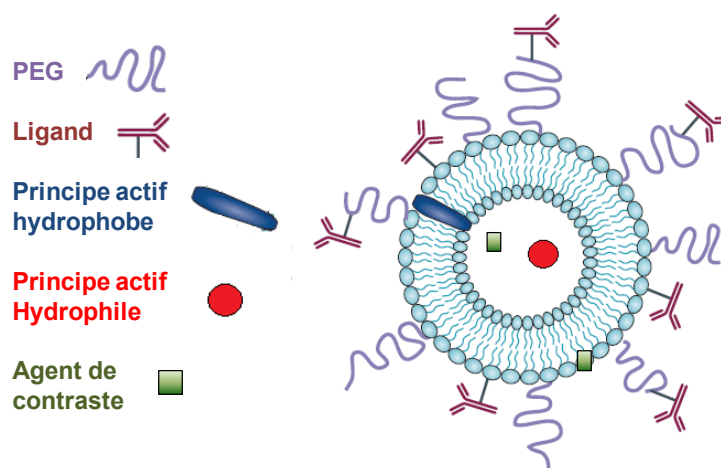


Figure 9 : Représentation d'un liposome multimodal⁴³

Les liposomes sont une alternative intéressante pour le ciblage, la délivrance de principe actif et l'imagerie. Cependant, ils ont rarement dépassé le stade pré-clinique. En effet, ils sont sujets à des problèmes de stabilité chimique (due notamment à l'hydrolyse des liaisons esters) et de stabilité physique (causée par l'aggrégation ou la fusion des vésicules). De plus, la stérilisation de ses composés reste un enjeu majeur. Les phospholipides sont des espèces thermolabiles et sont donc sensibles aux procédures de stérilisation qui nécessitent de chauffer ou d'irradier. Il est possible de les filtrer sur des membranes stériles (0,22 μm) mais ceci exclut les liposomes d'une taille supérieure à celle des pores des membranes. Par ailleurs, l'efficacité d'encapsulation des liposomes doit être élevée et permettre une délivrance suffisante du principe actif, puisque les lipides peuvent être toxiques à haute dose.⁴⁴

Un agent de contraste bimodal, pour l'IRM et l'imagerie de fluorescence, a été développé par l'équipe de Mulder.^{45,46} Des liposomes pegylés, de 150 nm de diamètre, constitués d'une dose importante de lipides contenant du Gadolinium, pour l'IRM, de Rhodamine, pour l'imagerie

optique et d'environ 700 peptides cycliques RGD par particule ont été synthétisés. Les études *in vitro* ont démontré que les liposomes-RGD s'associent de manière importante aux HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), surexprimant les intégrines $\alpha_v\beta_3$, et sont internalisés, contrairement aux liposomes-RAD, non spécifiques de ces intégrines. En effet, les cellules incubées avec les liposomes-RGD ont montré une fluorescence importante, et ont révélé un contraste IRM conséquent en comparaison avec les cellules incubées avec les liposomes-RAD. L'étude IRM *in vivo*, réalisée sur des souris nude présentant des tumeurs carcinomes du colon, a révélé que les liposomes-RGD s'accumulaient principalement au bord de la tumeur alors que les liposomes non spécifiques étaient dispersés dans toute la tumeur. Ceci est en accord avec la position préférentielle des vaisseaux sanguins angiogéniques aux abords de la tumeur. Pour compléter et valider l'étude IRM, une étude de fluorescence *ex vivo* a été réalisée. Elle a mis en évidence l'association des liposomes-RGD au niveau des vaisseaux sanguins tumoraux, suggérant ainsi une interaction spécifique avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ surexprimées par ces cellules endothéliales, Figure 10.

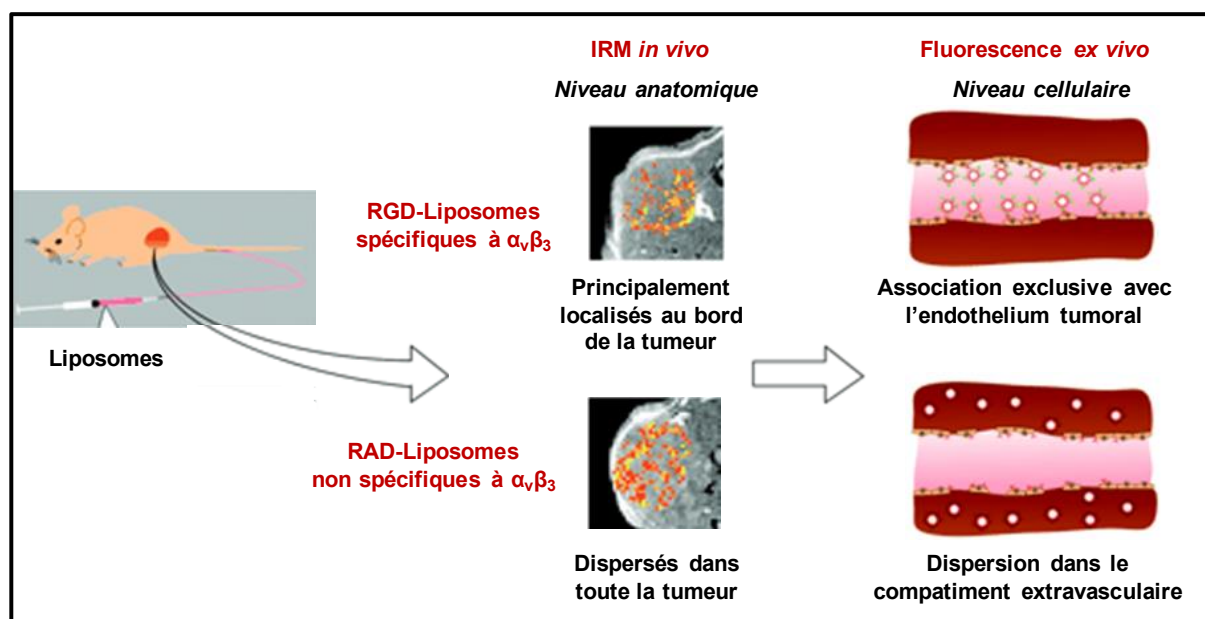


Figure 10 : Etude IRM *in vivo* et fluorescence *ex vivo* sur les souris présentant une tumeur⁴⁵

De plus, ces liposomes-RGD ont été utilisés pour évaluer de manière non invasive l'efficacité d'inhibiteurs d'angiogenèse au cours d'une thérapie. Des souris présentant des tumeurs de mélanome ont été traitées avec de l'endostatine ou de l'anginex pendant plusieurs jours. L'étude IRM *in vivo* a permis une évaluation rapide de l'efficacité de ces inhibiteurs d'angiogenèse, qui a montré un effet après 3 jours de traitement, en accord avec les analyses *ex vivo* par fluorescence.⁴⁷

IV. 2. 3. Les systèmes polymériques

La plupart des polymères utilisés pour le diagnostic ou la thérapie sont biocompatibles et/ou biodégradables et ont fait l'objet d'approbations par la FDA (*Food and Drug administration*). *In vivo*, ils doivent pouvoir être rapidement éliminés afin d'éviter les administrations répétées et leur accumulation. De plus, le polymère ainsi que ses produits de dégradation doivent être non toxiques et non immunogéniques. Ces systèmes polymériques sont ainsi préparés à partir de polymères naturels, synthétiques, ou de copolymères dont les plus souvent utilisés sont présentés dans le Tableau 3.

Matériel	Nom	Abréviation
Polymères naturels ou synthétiques	Poly(éthylèneglycol)	PEG
	Poly(acide lactique)	PLA
	Poly(acide glycolique)	PGA
	Poly(lactide- <i>co</i> -glycolide)	PLGA
	Poly(ϵ -coprolactone)	PCL
	Poly(éthylèneimine)	PEI
	Poly(L-lysine)	PLL
	N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide	HMPA
	Dextran	
	Chitosane	
Copolymères	Poly(acide lactique)-Poly(éthylèneglycol)	PLA-PEG
	Poly(lactide- <i>co</i> -glycolide)-Poly(éthylèneglycol)	PLGA-PEG
	Poly(ϵ -coprolactone)-Poly(éthylèneglycol)	PCL-PEG

Tableau 3 : Polymères les plus utilisés en théranostique⁴⁸

Le principe actif peut être dispersé à l'intérieur du polymère, et sera alors libéré par diffusion, ou conjugué au polymère et sera relargué, dans ce cas, lors de la dégradation du polymère (induite par exemple par un changement de pH ou de température).⁴⁹

Différentes techniques de préparation de ces nanoparticules polymériques ont été rapportées. L'utilisation de réactifs et solvants moins toxiques, la simplification de leur procédé de fabrication, l'efficacité de capture sont des enjeux majeurs lors de leur processus de fabrication.⁵⁰

Différents systèmes polymériques peuvent être distingués : les polymères linéaires comme les polymères « drug conjugates » ou « peptide conjugates », non linéaires tels que les dendrimères ou les micelles utilisées notamment pour le transport de substances faiblement solubles.⁴⁹ (Figure 11)

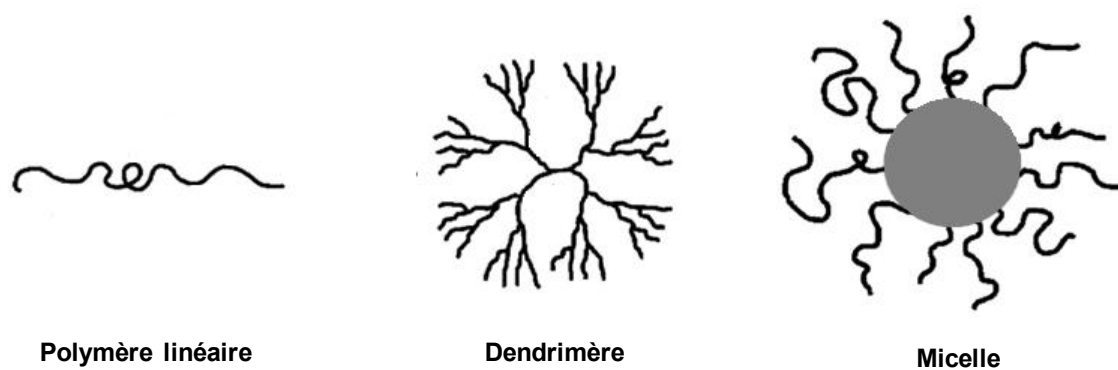


Figure 11 : Les différents systèmes polymériques⁴⁹

Les polymères « drug conjugates » ou « peptide conjugates » sont des constructions nanométriques qui associent de manière covalente un agent bioactif et un polymère. Ils assurent non seulement une circulation dans le sang prolongée permettant le ciblage des tumeurs par effet EPR mais aussi une libération efficace du principe actif dans le compartiment intracellulaire. Ils permettent de réduire la toxicité du principe actif tout en conservant leur efficacité thérapeutique. Ainsi, l'utilisation de ces polymères lors de thérapie ciblée a été étudiée.

Un copolymère du N-2-(hydroxypropyl)méthacrylamide (HPMA), biocompatible et soluble dans l'eau, a été couplé à une séquence RGD (environ 16 RGD4C par polymère) afin de cibler les vaisseaux angiogéniques, Figure 12. Des chaînes ont été incorporées pour complexer le technétium (^{99m}Tc) et l'yttrium 90 (^{90}Y). Une étude, réalisée sur des souris atteintes de carcinomes de la prostate, a montré, par scintigraphie, une accumulation au niveau des tumeurs. Une diminution du volume de la tumeur a été constatée après le traitement radiothérapeutique et une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales sans aucune toxicité radioactive au niveau des autres organes a été révélée grâce à une étude histopathologique.⁵¹

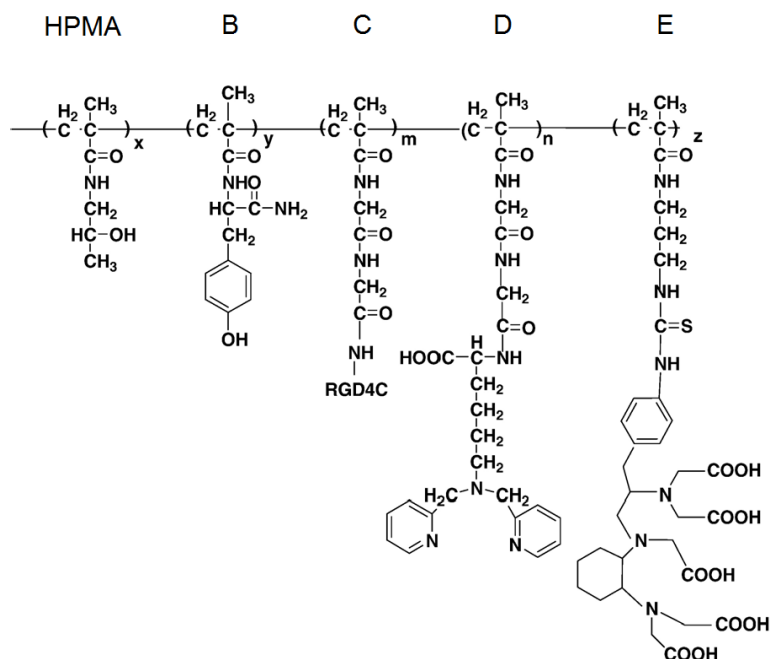


Figure 12 : Structure du copolymère HPMA; la chaîne B est utilisée pour le couplage d'isotopes de l'iode pour la radiothérapie; la chaîne C pour le couplage du RGD4C; la chaîne D pour complexer le technétium; et la chaîne E pour complexer l'yttrium

Un dendrimère est constitué de monomères qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central. Ce polymère, d'environ 10 nm, généralement de forme sphérique, hautement ramifié et plurifonctionnalisé grâce aux nombreuses fonctions terminales présentes en périphérie, a été introduit pour la première fois dans les années 1970 par le groupe de Tamalia. Un dendrimère est ainsi composé d'un noyau autour duquel sont associés des fragments identiques appelés dendrons. L'addition de couches successives (génération) augmente progressivement la taille moléculaire et le nombre de fonctions à sa surface, qui servent au couplage de molécules bioactives et qui ont un impact sur la solubilité. Ainsi, un dendrimère aux fonctions terminales hydrophiles pourra être soluble dans l'eau même si son cœur est hydrophobe. Les diverses ramifications engendrent entre elles des cavités internes, pouvant servir à l'encapsulation de molécules.

La composition chimique des dendrimères est variée, et détermine leur solubilité, leur dégradabilité et leur activité biologique. Parmi les dendrimères rencontrés dans les applications biologiques, les PANAM (polyamidoamine) (Figure 13) ont été largement étudiés.⁵²

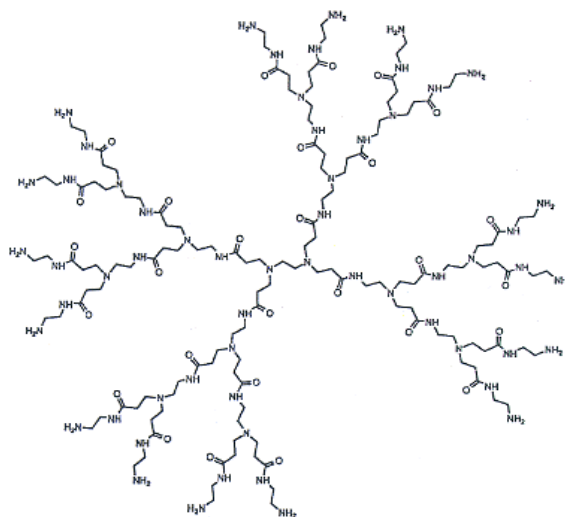


Figure 13 : PANAM (génération 2)

Afin d'imager l'angiogenèse, un dendrimère PANAM a ainsi été couplé à un peptide cyclique cRGDfK et à des agents de contrastes fluorescents (Alexa Fluor 594) et IRM (chélates de gadolinium). La microscopie de fluorescence a mis en évidence l'internalisation et la sélectivité du PANAM-RGD-Alexafluor594 pour les cellules M21, surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, contrairement au contrôle négatif PANAM-RAD-Alexafluor594. Cependant, l'addition des chélates de gadolinium à ce composé n'a pas montré le même niveau de sélectivité, sans doute dû à une augmentation du caractère hydrophobe et à son agrégation.⁵³

Les micelles sont des particules colloïdales de taille comprise entre 5 et 100 nm. Elles sont constituées d'agents amphiphiles. A faible concentration dans un milieu aqueux, ces agents existent sous forme de monomères, mais lorsque la concentration augmente et atteint la CMC (concentration micellaire critique), ils s'assemblent, formant ainsi les micelles. Les micelles polymériques ont une CMC faible (10^{-6} à 10^{-7} M), ce qui les rend relativement insensibles à la dilution, et permet d'améliorer leur temps de circulation.

Le cœur hydrophobe est ainsi recouvert par une coque hydrophile, ce qui permet d'encapsuler et donc de protéger des molécules hydrophobes. Les polymères constitutifs des micelles sont choisis de sorte que la partie hydrophile engendre une stabilité stérique et évite l'élimination rapide par le système réticulo-endothélial, et que la partie hydrophobe possède une capacité d'incorporation élevée et une bonne compatibilité vis-à-vis de la molécule hydrophobe. Le PEG est le polymère hydrophile le plus utilisé pour sa biocompatibilité, sa solubilité dans l'eau et sa faible toxicité. Les polyesters, polyéthers et les acides polyamines tels que les PLA, PCL, PLL sont les plus couramment exploités pour la formation du noyau hydrophobe. Par ailleurs, il a été démontré que la modification de leur groupe terminal peut engendrer une

stabilisation des micelles et augmenter la compatibilité et l'incorporation de la molécule hydrophobe.⁵⁴

Des micelles polymériques multifonctionnelles, d'environ 50 nm de diamètre, capables de cibler les intégrines $\alpha_v\beta_3$, de délivrer un agent cancéreux et doter d'agent de contraste IRM ont été développées par Nasongkla et son équipe, Figure 14. La doxorubicine et des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIO) (8 nm de diamètre) ont été incorporées dans le cœur hydrophobe des micelles composées de PLA et de PEG. Les chaînes PEGylées ont été modifiées par des fonctions maléimides pour permettre le couplage avec le ligand RGD, via une liaison covalente thiol-maléimide. Des expériences *in vitro* ont été réalisées sur des cellules endothéliales SLK (dérivées des sarcomes de Kaposi humains) surexprimant $\alpha_v\beta_3$. Le couplage du peptide RGD sur les micelles a permis une amélioration de leur internalisation, constatée par imagerie IRM, cytométrie de flux, et microscopie confocale. L'incorporation de doxorubicine a engendré une augmentation de la cytotoxicité. En comparaison avec une étude précédente, l'utilisation de PLA à la place de PCL a permis de faciliter la diffusion de la doxorubicine à travers la matrice polymérique et de libérer plus rapidement le principe actif.⁵⁵

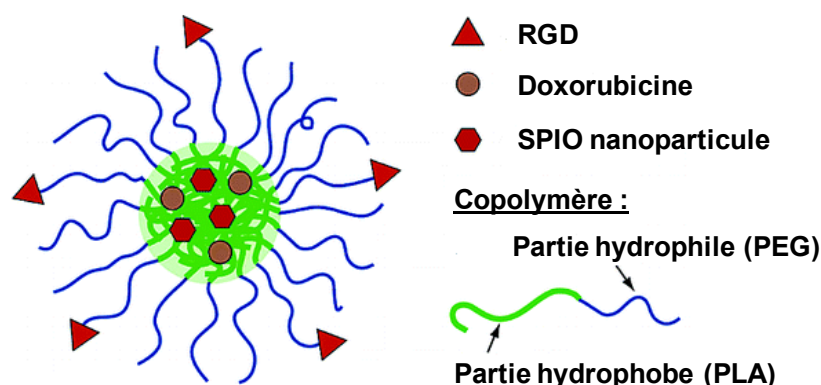


Figure 14 : Micelle polymérique multifonctionnelle⁵⁵

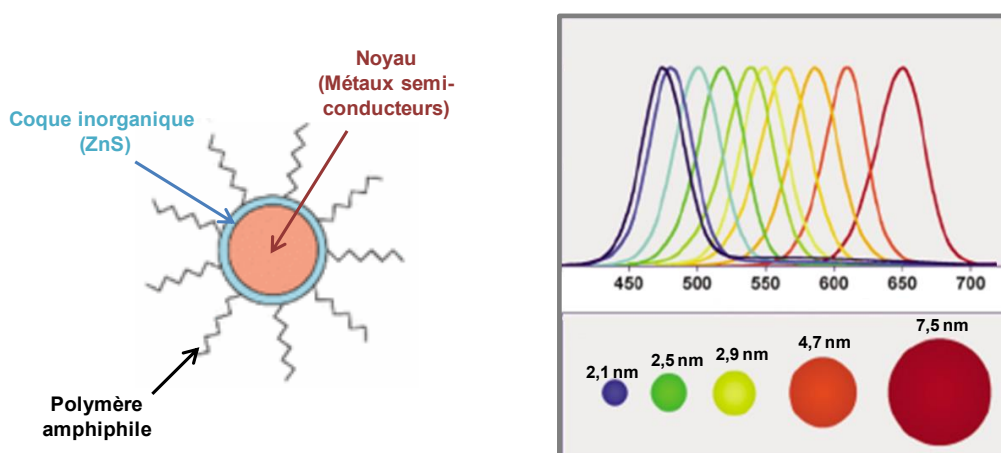
IV. 2. 4. Les nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules inorganiques incluent notamment les nanoparticules semi-conductrices ou Quantum Dots (QD), les nanoparticules d'or, les nanotubes de carbone et les nanoparticules d'oxyde de fer. Leurs propriétés optiques ou magnétiques, qui peuvent être ajustées en fonction de leur composition, leur structure, leur taille ou leur forme, ont permis leur utilisation en tant qu'agent de contraste pour le diagnostic. Une modification de leur surface est souvent nécessaire pour améliorer leur biocompatibilité, ou permettre le couplage de molécules d'intérêt.⁵⁶

IV. 2. 4. 1. Les Quantum dots

Les Quantum Dots (QDs) sont des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents de forme généralement sphérique dont les dimensions sont de l'ordre de 2 à 10 nm. Leurs propriétés optiques peuvent être modifiées en changeant notamment leur taille, ou leur composition, ils peuvent ainsi émettre de 400 à 2000 nm.⁵⁷

Ils présentent des avantages par rapport aux fluorophores organiques conventionnels (par exemple la fluorescéine, ou la rhodamine) : spectre d'émission étroit, rendement quantique élevé, faible photoblanchiment, résistance à la dégradation chimique. Les QDs sont généralement composés d'un cœur de Sélénure de Cadmium (CdSe) ou de Tellure de Cadmium (CdTe), protégé par une coquille de Sulfure de Zinc (ZnS). La stratégie la plus courante afin de rendre les QDs hydrosolubles et stables en milieu biologique, est de les encapsuler dans une seconde coque de polymères amphiphiles. Ils peuvent ensuite être fonctionnalisés par des molécules d'intérêt par attraction électrostatique, liaison covalente ou adsorption, Figure 15.



Du fait de leur photostabilité, leur application dans l'imagerie est prometteuse. Ils peuvent également être utilisés en thérapie photodynamique (PDT) (qui permet de générer localement un agent cytotoxique, l'oxygène singulet, suite à l'activation d'un photosensibilisateur) en tant que photosensibilisateur ou servir à l'activation d'un autre photosensibilisateur. Cependant, leur principal problème reste leur toxicité. En effet, leurs composants (Cd, Se par exemple) sont hautement toxiques. Une surface de recouvrement instable pourrait exposer le noyau aux rayons UV et à l'air, entraînant alors un relargage d'ions cadmium, sélénium ou tellure. La couche ZnS protège le noyau de l'oxydation par l'air mais n'a pas d'effet sur les rayons UV.

Par ailleurs, une préoccupation demeure sur leur stockage et leur élimination sans libération d'ions toxiques et le risque de propagation dans l'écosystème.⁵⁹

Des QDs couplés à un peptide RGD ont été développés afin de cibler et d'imager les tumeurs *in vivo*.⁶⁰ Ils sont composés d'un noyau CdTe, recouverts d'une coque de ZnS puis ont été encapsulés dans une coque de PEG (2000 MW) portant une fonction amine terminale. Cette fonction terminale a été modifiée afin d'obtenir en surface des fonctions maléimide servant au couplage du dérivé soufré du peptide c(RGDyK). Ainsi, des QDs d'environ 15-20 nm ont été obtenus, comportant chacun 30 à 50 peptides RGD. Les images de fluorescence ont mis en évidence l'affinité des QD-RGD vis-à-vis des intégrines $\alpha_v\beta_3$, *in vitro* sur les cellules MDA-MB-435 (cancer du sein) et U87MG (glioblastomes), surexprimant ces intégrines, et *ex-vivo* sur des tissus tumoraux U87MG. De plus, des injections de QDs (sans peptide) et de QD-RGD sur des souris nude porteuses de tumeurs U87MG (dans l'épaule gauche) ont été réalisées. Un signal de fluorescence non significatif a été observé dans la tumeur après l'administration des QDs, alors qu'une fluorescence importante et maximum a été détectée dans la tumeur 6h après l'administration des QD-RGD. Ces expériences ont démontré avec succès l'utilisation des QD-RGD en tant qu'agent de ciblage et d'imagerie tumorale.

IV. 2. 4. 2. Les nanoparticules d'or

Les nanoparticules métalliques, en particulier les nanoparticules d'or, sont des candidats intéressants pour le diagnostic et la thérapie car elles possèdent d'excellentes propriétés physiques et chimiques. En effet, leur taille peut être facilement contrôlée (de 0,8 à 200 nm), leur forme variée et leur surface modifiée afin de fournir diverses fonctionnalités (utilisables pour le couplage de molécules biologiques) et une bonne biocompatibilité. Leur trajectoire dans les cellules est facilement repérable car elles peuvent absorber et/ou diffuser dans une large gamme spectrale (visible - proche infrarouge).⁶¹ En effet, la propriété intrinsèque la plus remarquable des nanoparticules d'or est liée au phénomène de résonance plasmon de surface. Cette oscillation collective des électrons libres a pour effet de provoquer l'apparition d'une bande d'absorption (bande de plasmon) qui dépend notamment de la forme des nanoparticules. Pour les nanosphères d'or, la résonance se produit entre 515 et 575 nm pour des tailles comprises entre 9 et 99 nm,⁶² tandis que pour les nanobâtonnets d'or, les électrons oscillent selon l'axe latéral et longitudinal, provoquant une forte bande de plasmon dans la région proche infrarouge (permettant une pénétration maximale de la lumière à travers les tissus) et une plus faible dans la région du visible (similaire à celle des nanosphères)⁶³, Figure 16.

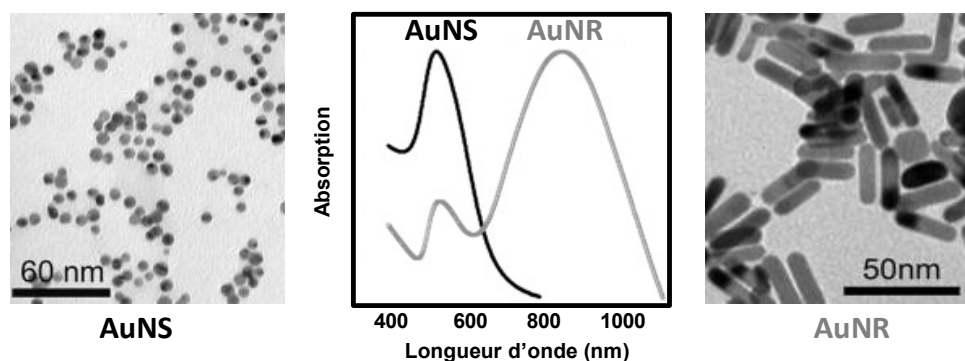


Figure 16 : Images TEM (Microscopie Electronique à Transmission) de nanoparticules d'or (AuNS) à gauche, de nanobâtonnets d'or (AuNR) à droite, et leurs spectres d'absorption au centre⁶⁴

Les nanoparticules d'or peuvent jouer un rôle lors du transport et de la délivrance de principes actifs, néanmoins leur application centrale est basée sur la thérapie photothermique. En effet, elles peuvent absorber de la lumière puis la convertir en chaleur entraînant ainsi une destruction des cellules cancéreuses. Par ailleurs, les nanoparticules d'or de très petits diamètres (moins de 2 nm), capables de pénétrer dans les cellules et les compartiments cellulaires (tels que le noyau) sont extrêmement toxiques. Dotées d'agents de ciblage, elles sont ainsi une alternative intéressante pour la thérapie anti angiogénique.⁶⁵

Des nanobâtonnets d'or PEGylés ⁶⁶ ont été synthétisés. Leur surface présente des fonctions acides carboxyliques, qui sont utilisées pour coupler un peptide cyclique : le cRGD pour cibler les intégrines ou le cRAD pour le contrôle négatif. Les études *in vitro*, sur les cellules U87MG, ont montré la biocompatibilité de la nanoplateforme cRGD et son affinité vis-à-vis des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et les images TEM ont révélé son internalisation dans le cytoplasme des cellules. Des expériences *in vivo* ont été réalisées sur des souris porteuses de glioblastomes. L'imagerie proche infrarouge (NIR) a montré une augmentation significative du signal d'absorption dans la région tumorale, suite à l'injection de la nanoplateforme cRGD, démontrant ainsi son utilité pour l'imagerie tumorale.

IV. 2. 4. 3. Les nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone ont du potentiel en biomédecine, en tant qu'agent de contraste ou vecteur de principes actifs. Ces molécules cylindriques faites d'atomes de carbone sont regroupés en plusieurs catégories : les nanotubes de carbone monofeuillets (SWNT) constitués d'un feuillet de graphène et les nanotubes de carbone multifeuillets, constitués de plusieurs feuillets de graphène enroulés les uns autour des autres, Figure 17.

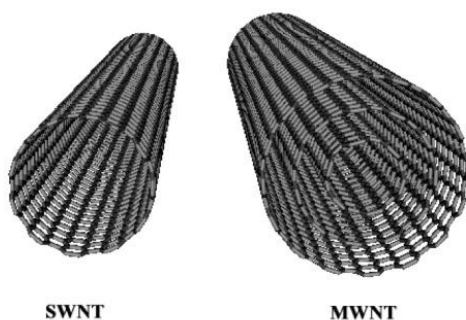


Figure 17 : Les nanotubes de carbone mono et multifeuillets (SWNT et MWNT)⁶⁷

Les nanotubes de carbone suscitent un grand intérêt dans bien des domaines pour leurs propriétés exceptionnelles. Ils sont d'une excellente rigidité tout en étant extrêmement légers, et peuvent être métalliques ou semi-conducteurs selon leur géométrie. Cependant leur faible solubilité et leur toxicité restent un frein quant à leur application biologique.⁶⁷ La toxicité et l'immunogénicité sont liés à différents facteurs tels que le nombre de feuillets, la longueur, la surface, l'agrégation, la fonctionnalisation, ou la méthode de fabrication.

Pour surmonter ces problèmes, les nanotubes de carbone ont été modifiés en surface. Des polymères biocompatibles ont notamment été utilisés pour leur fonctionnalisation de manière covalente ou non covalente, entraînant une diminution radicale de leur toxicité, tout en améliorant leur dispersion.^{68,69} Néanmoins, le couplage peut altérer les propriétés physico-chimiques des nanotubes (solubilité, forme, propriétés optiques). Les méthodes covalentes peuvent dégrader partiellement le tube, entraînant la perte de certaines propriétés, mais elles fournissent une meilleure solubilité et stabilisation que les méthodes non covalentes. Cependant, ces dernières ont l'avantage d'assurer une conservation de leurs propriétés optiques et électriques. Cette fonctionnalisation permet par la suite le couplage de diverses molécules bioactives. Ainsi, des nanotubes de carbone capables de traverser les membranes cellulaires, de cibler les tumeurs et de délivrer un principe actif ont été développés. Grâce à leurs propriétés intrinsèques, les SWNT ont été utilisés pour l'imagerie biomédicale photoacoustique, qui repose sur la génération d'onde acoustique suite à l'absorption d'une énergie lumineuse. L'absorption importante des SWNT pendant une irradiation laser proche infrarouge les rend ainsi utiles pour la thérapie photothermique. La longueur des nanotubes influence leur capacité à transférer la chaleur et à tuer les cellules tumorales.⁷⁰

Des nanotubes de carbone monofeuillets (SWNT), de 1 à 2 nm de diamètre, et de 50 à 300 nm de diamètre ont été fonctionnalisés par un polymère, via la fonction phospholipide d'un PEG 5000, puis des peptides cycliques RGD ont été couplés. Le couplage du peptide n'ayant pas affecté le signal photoacoustique des SWNT, ils ont ainsi été utilisés en tant qu'agent de

contraste pour l'imagerie photoacoustique des tumeurs. Des injections de SWNT et SWNT-RGD ont été réalisées sur des souris porteuses de glioblastomes (U87MG). L'imagerie a montré un signal 8 fois plus important dans la tumeur pour les SWNT-RGD, 4 h après l'injection, révélant ainsi l'utilité des SWNT pour l'imagerie non invasive du cancer.⁷¹

D'autres nanotubes de carbone monofeuillets (SWNT), de 1,3 nm de diamètre et 200 nm de longueur en moyenne, également fonctionnalisés avec un PEG-phospholipide (PL), ont été synthétisés pour cibler les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et vectoriser un agent thérapeutique. Leur surface, ayant une grande affinité pour les molécules aromatiques (π -stacking), a été utilisée pour le couplage non covalent d'un agent anticancéreux, la doxorubicine (DOX). Un peptide cyclique RGD (cRGDyK) a ensuite été couplé sur les extrémités des chaînes PEG. Des études *in vitro* sur les cellules U87MG et MCF-7 ont été réalisées. Les nanotubes PL-SWNT-DOX ont montré un effet toxique plus faible que l'agent cancéreux sur les deux types cellulaires alors que les nanotubes PL-SWNT-RGD-DOX ont montré une toxicité plus importante sur les U87MG, comparable à celle de l'anticancéreux, suggérant ainsi leur spécificité vis-à-vis des intégrines.⁷²

IV. 2. 4. 4. Les nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules d'oxyde de fer (de magnétite, Fe_3O_4 ou de maghémite, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ont prouvé leur efficacité en tant qu'agent de contraste IRM pour le diagnostic des tumeurs solides et peuvent être utilisés en tant que vecteur pour le guidage magnétique ou comme nanosource de chaleur pour l'hyperthermie.^{73,74,75} En deçà d'une taille de l'ordre de 20 nm, ces particules présentent un état magnétique particulier : le superparamagnétisme. (voir Annexe 1)

Deux catégories de particules sont différenciées⁷⁶ :

- Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIO, Superparamagnetic Iron Oxides) qui ont une taille hydrodynamique supérieure à 50 nm. Des SPIO, capables d'imager les tumeurs du foie et les métastases, sont disponibles sur le marché et commercialisés sous le nom de Endorem® ou Revovist®.
- Les petites nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (USPIO, Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides) qui ont une taille inférieure à 50 nm, et de ce fait un temps de circulation plus long.

Les nanoparticules d'oxyde de fer présentent des avantages considérables en tant qu'agent de contraste : un signal magnétique important, une augmentation du contraste pendant une longue durée, une amélioration des délimitations des tumeurs et une faible cytotoxicité. En effet, des études ont montré que le fer libéré lors de leur dégradation est métabolisé par le corps, réduisant ainsi leur cytotoxicité à long terme.⁷⁷

Ces nanoparticules sont synthétisées à partir de différentes méthodes (co-précipitation, décomposition thermique, système micellaire...). (voir Annexe 1) En termes de synthèse chimique, l'obtention de nanoparticules magnétiques avec une population étroite et monodisperse à grande échelle est un challenge. Afin d'empêcher l'agrégation et de les doter de propriétés pharmacologiques, une surface hydrophile est nécessaire. Elles sont donc fonctionnalisées en surface par des petites molécules ou des polymères (dextran, amidon, PLGA, PEG). Selon la molécule choisie et son interaction vis-à-vis de la surface, le système présente des propriétés physicochimiques différentes : taille finale, densité du recouvrement, potentiel de surface. Par ailleurs, ces molécules peuvent être bi-fonctionnelles, c'est-à-dire qu'une fonction est utilisée pour interagir avec le cœur inorganique et une autre fonction à la surface externe de la nanoplateforme est utilisée pour le couplage de molécules d'intérêts.

Des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (de 10 nm de diamètre) multifonctionnelles ont été synthétisées par décomposition thermique. La nitrodopamine a été utilisée pour rendre soluble dans l'eau ces nanoparticules hydrophobes et a servi aux couplages de diverses molécules. En effet, pour fonctionnaliser ces SPIOs, des esters NHS (*N*-hydroxysuccinimide) de mono-éthylmalonate, de PEG₁₁₄-Maléimide et de PEG₁₁₄-Méthoxy ont été conjugués. Le premier a été utilisé, après substitution avec un hydrazide, pour coupler la doxorubicine via un lien hydrazone, sensible au pH ; le deuxième, pour le couplage d'un peptide cyclique cRGDfC et d'un chélateur de l'isotope du cuivre ⁶⁴Cu, la NOTA (l'acide macrocyclique 1,4,7-triazacyclononane-*N,N',N''*-triacétique) ; et le troisième sert à la stabilité de la nanoplateforme dans les conditions physiologiques, Figure 18. L'efficacité de ces nanoparticules en tant qu'agent de contraste IRM a été évaluée *in vitro*, sur les cellules U87MG, via des mesures de relaxivité. Les SPIO-RGD ont montré une plus grande capture cellulaire amenant à une plus grande cytotoxicité et une accumulation plus importante dans les tumeurs que les SPIO sans RGD. Ceci est en accord avec l'imagerie PET, réalisée *in vivo* sur des souris porteuses de glioblastomes, et les études de biodistribution *ex vivo*. Ainsi ces nanoparticules ont démontré des propriétés intéressantes pour la double imagerie PET/IRM et la délivrance d'un agent anticancéreux.⁷⁸

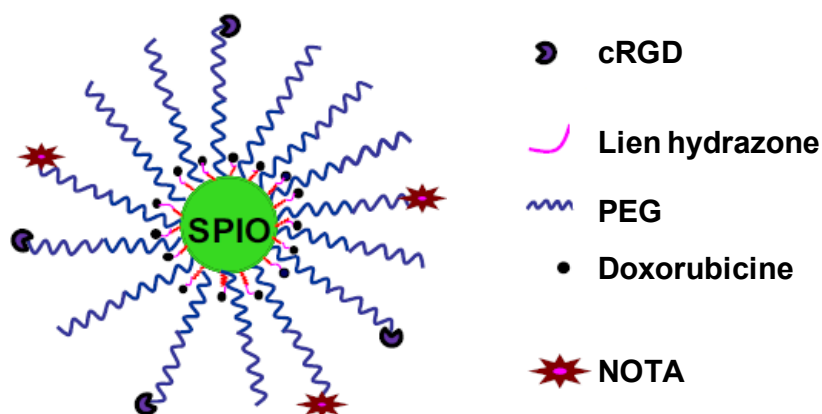


Figure 18 : SPIO multifonctionnelle pour la théranostique⁷⁸

Le ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ lors du processus angiogénique tumoral a été largement exploré pour l'imagerie et le traitement des tumeurs. Ces intégrines semblent être également des molécules clés lors des divers processus impliqués dans d'autres maladies telles que l'athérosclérose.⁷⁹

IV. 2. 5. Le ciblage des intégrines dans l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires

Les intégrines $\alpha_v\beta_3$, fortement exprimées dans les plaques d'athérome par les cellules musculaires lisses du média et de l'intima et par les cellules endothéliales des microvaisseaux angiogéniques, jouent ainsi un rôle important dans l'athérosclérose.^{80,81,82} Son rôle a été démontré pour la première fois dans les expériences de Winter *et al.* sur des lapins (cholestérol fed)⁸³. L'expansion du vasa vasorum a été montrée par IRM en utilisant des nanoparticules paramagnétiques ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ exprimées par les cellules endothéliales.

L'expansion angiogénique du vasa vasorum suggère qu'une thérapie anti-angiogénique pourrait aider à stabiliser ou réduire les plaques. Ainsi des expériences ont été réalisées en utilisant des nanoparticules paramagnétiques à base de chélates de gadolinium constituées d'un mîme pour le ciblage des intégrines et d'un agent anti-angiogénique, le fumagillin. Ces particules ont permis de générer un contraste IRM à partir des artères rénales jusqu'au diaphragme. Sept jours après ce premier traitement, les nanoparticules ont été réadministrées et une diminution du contraste IRM a été constatée, suggérant une réduction de la

néovasculature dès la première administration. Cette étude a ainsi illustré le potentiel d'agent théranostique pour cibler l'athérosclérose et délivrer efficacement un médicament.⁸⁴

Cependant, le rôle de l'angiogenèse lors de ces maladies est un sujet controversé non résolu et suscite divers points de vue. Ainsi, les thérapies angiogéniques via la sécrétion de cytokines sont aussi considérées comme une démarche attractive pour traiter la cardiopathie ischémique (qui est liée à une insuffisance des apports d'oxygène au muscle cardiaque résultant du développement et des complications de l'athérosclérose au niveau d'une (ou plusieurs) artère(s) coronaire(s)). Inversement, d'autres études, comme celles de Winter *et al.* précédemment décrites, suggèrent que la néovascularisation contribue à la croissance des lésions athérosclérotiques et, de ce fait, est un facteur clé de la déstabilisation de la plaque menant à sa rupture.⁸⁵

L'élaboration d'un agent diagnostique ou théranostique nécessite la présence de diverses entités chimiques. La fonctionnalisation de surface de ces vecteurs via des biomolécules (fluorophores, peptides, peptidomimétiques, protéines, anticorps...) peut être réalisée selon diverses stratégies. La première consiste à tirer profit des interactions électrostatiques entre la biomolécule et le vecteur conduisant à des liaisons non covalentes. La seconde permet de lier covalamment ces deux partenaires via des réactions de bioconjugaison. C'est cette deuxième approche, que nous avons utilisé dans ce travail et que nous détaillerons dans la partie suivante.

V. Stratégie de couplages - Réactions de bioconjugaison

Différentes réactions de couplages permettent de créer une liaison covalente entre deux partenaires et sont fonctions de la complémentarité entre les fonctions réactives présentes sur les deux entités. La Figure 19 présente les principales réactions utilisées.

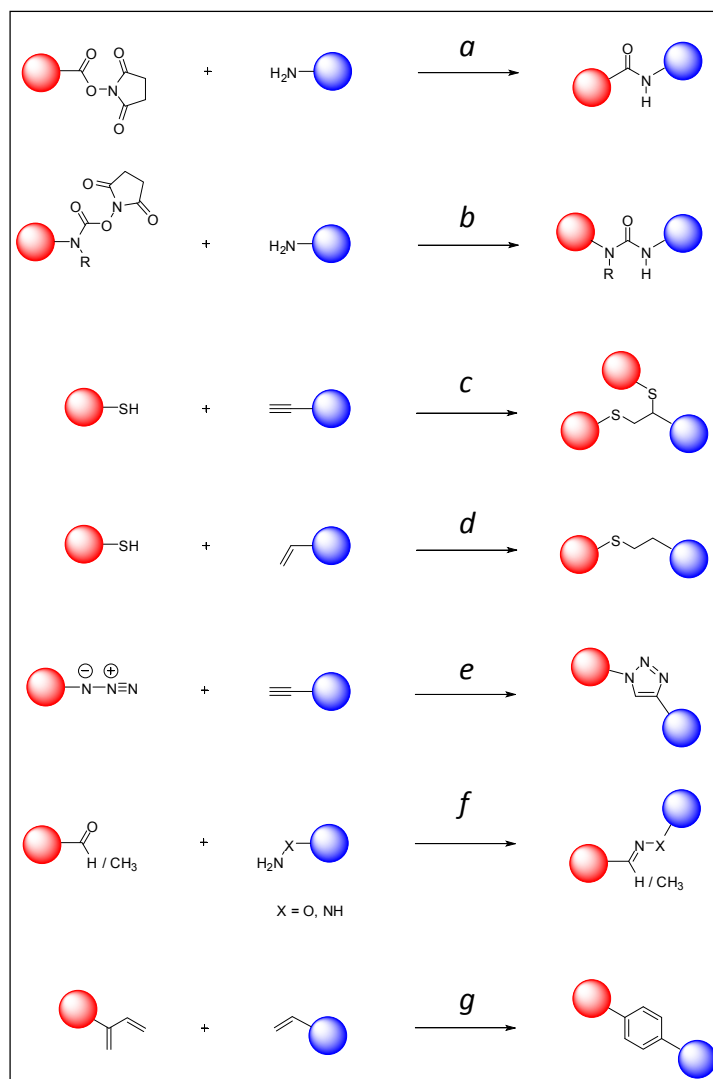


Figure 19 : Réactions de bioconjugaisons (A) entre un ester activé et une amine ; (B) entre un carbamate actif et une fonction amine ; (C) entre une fonction thiol et alcyne, réaction thiol-yne ; (D) entre une fonction thiol et un alcène ; (E) entre une fonction azide et alcyne, réaction de Huisgen ; (F) entre un carbonyle et une oxy-amine ; (G) réaction entre un diène et un diénophile (Diels Alder)

Concernant les peptides, les fonctionnalités les plus utilisées pour le couplage sont les fonctions amines (disponibles en position *N*-terminale du squelette, ainsi que les chaînes latérales d'acides aminés naturels tels que la lysine) ou thiols (disponibles sur la chaîne latérale de la cystéine). L'introduction d'acides aminés non-naturels a permis d'élargir la gamme des fonctionnalités disponibles.⁸⁶ Cependant, l'utilisation de molécules biologiques implique des limitations importantes sur les conditions de réaction (solvant, concentration, température).

Au cours de ce travail, nous avons utilisé deux stratégies de couplage :

- la formation de liaisons amides par chimie des carbodiimides (Figure 20A)
- les réactions dites de chimie click (Figure 20C-E)

Ces deux approches sont décrites dans les paragraphes suivants.

V. 1. Chimie des carbodiimides

La réactivité des fonctions amines sur les fonctions acides carboxyliques étant faible, il est nécessaire d'activer ces dernières fonctions en utilisant des agents de couplage qui vont augmenter leur réactivité. Cette réaction aboutit à une liaison covalente de type amide selon le schéma présenté Figure 20. Le greffage covalent se décompose en deux étapes.

La première étape consiste à activer les fonctions carboxyliques à pH acide. Cette activation est réalisée avec le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), dérivé de la famille des carbodiimides soluble dans l'eau, et conduit à un dérivé instable réagissant facilement avec les espèces nucléophiles telles que les amines.

La seconde étape est le couplage à proprement dit entre l'acide carboxylique et l'amine qui se réalise à pH basique. Il est important de maintenir le pH basique afin que les fonctions amines primaires soit sous forme déprotonnées et que celles-ci puissent réagir avec la fonction acide carboxylique activée. En effet, sous forme d'ammonium protonné, le doublet libre de l'atome d'azote de la fonction amine primaire est engagé dans une liaison avec un atome d'hydrogène. Il ne peut donc pas y avoir d'attaque nucléophile de celui-ci sur le carbonyle de l'acide carboxylique activé. D'autre part, pour l'ajustement à pH basique, l'utilisation de la *N,N*-diisopropyléthylamine est préférée à l'utilisation de la soude (NaOH) car les fonctions hydroxyles sont beaucoup trop nucléophiles en comparaison aux amines primaires. Ces groupements -OH pourraient interférer dans la réaction se substituant aux fonctions amines primaires lors de l'attaque nucléophile sur le carbonyle.

Le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) est utilisé pour favoriser le couplage carbodiimide en présence d'EDC.⁸⁷ La réaction implique la formation de l'ester actif intermédiaire, l'ester de *N*-hydroxysuccinyle qui réagit avec la fonction amine pour donner la liaison amide. L'association EDC/NHS est souvent favorisée car l'intermédiaire réactif est plus stable et le rendement de réaction est supérieur.⁸⁸

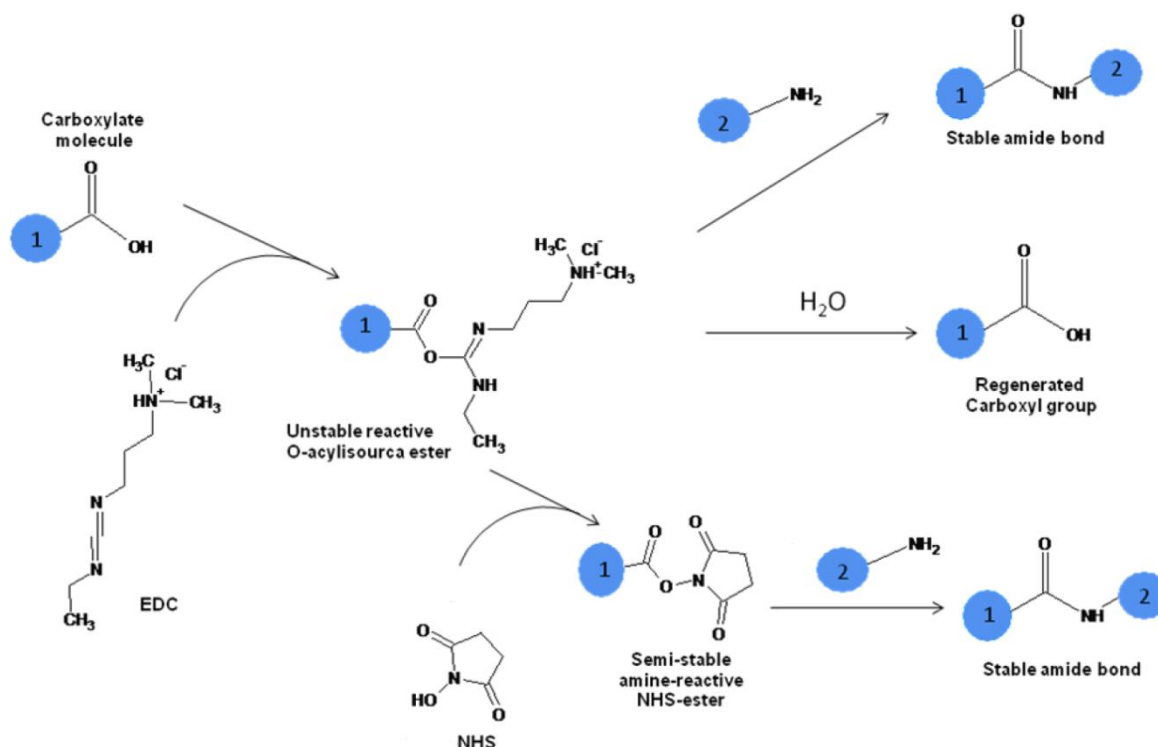


Figure 20 : Méthode de couplage par la chimie des carbodiimides

V. 2. La « click chemistry »

Sharpless *et al.*⁸⁹ ont introduit en 2001 le concept de la « click chemistry » avec pour objectif le développement d'une large gamme de blocs sélectifs, modulables et facilement assemblables. Cette chimie englobe toutes les réactions répondant à une série de critères précis : l'utilisation de réactifs facilement disponibles, de solvants « verts » ou pouvant être facilement éliminés, des conditions expérimentales et purification simples, des réactions à haut rendement, stéréospécifiques et générant des sous produits inoffensifs. Ces réactions nécessitent généralement une forte enthalpie de réaction afin de conduire à un produit unique. Plusieurs classes de transformations chimiques peuvent ainsi être considérées comme réactions de « click chemistry ». Dans ce travail, nous avons utilisé la réaction de cycloaddition 1,3 de Huisgen⁹⁰ catalysée par le cuivre (I) et la réaction thiol-yne.⁹¹ Ces deux méthodes sont décrites ci dessous.

V. 2. 1. La réaction de cycloaddition de Huisgen

La réaction de cycloaddition de Huisgen est une réaction entre un azoture et un alcyne terminal conduisant à la formation d'une liaison 1,2,3-triazole, Figure 21. La formation d'un mélange de composés 1,4- et 1,5-régioisomère est généralement obtenue.⁹² Cette absence de

régiosélectivité, couplée à des temps de réaction longs, nécessitant des températures élevées, a limité l'intérêt porté à la cycloaddition.

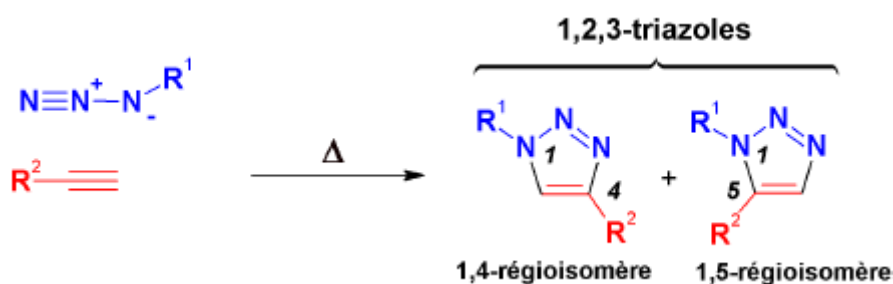


Figure 21 : Cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne vrai et un azoture

Cependant, l'utilisation du cuivre (I) sur cette réaction a permis la formation exclusive du 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué, à température ambiante et avec des temps de réaction beaucoup plus rapides. Différents sel de cuivre peuvent être utilisés pour catalyser la réaction de Huisgen, associés à des solvants organiques ou non. La tolérance vis-à-vis de la température, sur un large domaine de pH, dans une grande variété de solvants et sa compatibilité avec l'utilisation de micro-ondes⁹³ rendent la réaction attrayante. Un mécanisme a été proposé, Figure 22, afin de mieux saisir le rôle du cuivre et l'orientation vers le composé 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué. Le cycle catalytique commence par la formation d'un complexe Cu-acétylide (2), suivi d'un complexe Cu-acétylide-azoture (3) qui se cyclise en formant un métal-cycle intermédiaire (4). Une fois le triazole formé (5), il y a régénération du catalyseur par scission de la liaison Cu-C.

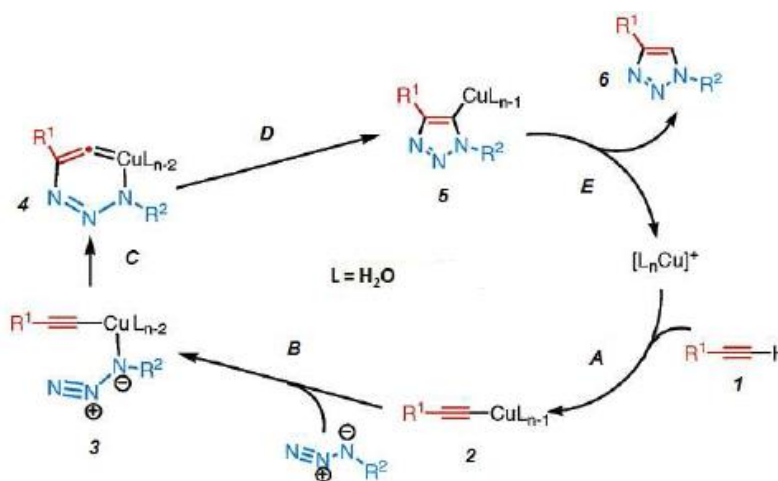


Figure 22 : Mécanisme de la cycloaddition d'Huisgen catalysée par le cuivre (I)⁹⁴

V. 2. 2. La réaction thiol-yne

La deuxième réaction de « click chemistry » étudiée est la réaction thiol-yne, qui conduit à la formation de deux liaisons carbone-soufre lors de la réaction d'un alcyne avec un thiol, Figure 23.

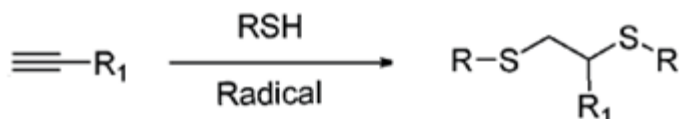


Figure 23 : Réactions entre un alcyne et un thiol

Le mécanisme de cette réaction repose sur un processus radicalaire, Figure 24. Un radical thiol est généré soit par la chaleur soit par la lumière, avec l'aide d'un photoinitiateur, et réagit avec la liaison alcyne pour créer un radical réactif intermédiaire, le radical vinylthioéther. Ce dernier, par transfert de chaîne avec la molécule présentant la fonction thiol, forme le composé vinylthioéther (partie 1). Un deuxième radical thiol s'additionne sur ce composé pour former un second radical intermédiaire qui est soumis à une seconde réaction de transfert et mène au produit de double addition de la réaction de thiol-yne (partie 2). Un radical thiol est généré et rentre dans ce processus de chaîne.

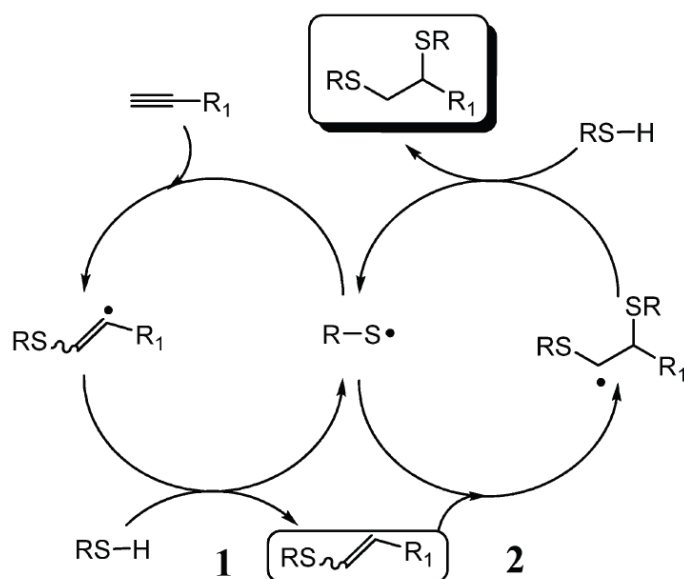


Figure 24 : Mécanisme de la réaction de thiol-yne⁹⁵

V. 3. Apport des micro-ondes

De nombreuses réactions de synthèse organique sont accélérées lorsqu'elles sont effectuées sous micro-ondes (réactions en quelques minutes au lieu de plusieurs heures) et conduisent à

de meilleurs rendements. L'application des micro-ondes engendre une élévation de température qui s'exerce instantanément dans toute la masse de la matière (et non par diffusion progressive à partir de la surface). L'absence de surchauffe superficielle évite d'éventuelles décompositions thermiques. Seules les molécules polaires, typiquement celles de l'eau mais aussi celles de nombreux composés chimiques renfermant un groupement polaire (fonctions oxygénée, azotée, halogénée...), sont concernées. Chaque alternance de sens du champ électrique, de haute fréquence, entraîne un changement d'orientation des dipôles, induisant un échauffement de la matière.⁹⁶

Au laboratoire, différentes études ont été réalisées et ont montré l'efficacité du greffage sous micro-ondes de molécules fluorescentes sur des nanoparticules d'oxyde de fer. La première étude, menée par Benyettou *et al.*⁹⁷, a consisté à étudier le couplage par chimie des carbodiimides de la Rhodamine B sur des nanoparticules d'oxyde de fer $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ fonctionnalisées en surface par des molécules d'alendronate. La nanoplateforme $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Alendronate}$ présente ainsi en surface des fonctions amines terminales. Pour le couplage, les fonctions acides carboxyliques de la Rhodamine B ont d'abord été activées (par EDC/NHS) puis le couplage entre les deux entités a été effectué. L'efficacité de couplage a été caractérisée à l'aide de différentes techniques d'analyse : les spectroscopies de fluorescence et UV, la spectroscopie infrarouge, la diffusion de la lumière (taille hydrodynamique et potentiel de surface), et la technologie MIAplex (développée par la société Magnisense, qui mesure la dérivé seconde de la courbe d'aimantation (Annexe 1)). Ainsi, il a été montré, par fluorescence et par UV (après décrochage des fluorophores de la nanoplateforme), qu'une augmentation du rapport R (qui représente le nombre de fonctions acides du fluorophore sur le nombre de fonctions amines de la nanoparticule) permettait d'améliorer le taux de greffage que ce soit à température ambiante ou sous micro-ondes. De plus, pour un même rapport R, le taux de greffage a été amélioré grâce à l'utilisation des micro-ondes, Figure 25A. Par ailleurs, il a été montré par infrarouge, qu'une augmentation du ratio R entraîne l'augmentation progressive des signaux caractéristiques de la Rhodamine B et la diminution de la bande de vibration fer-oxygène, Figure 25C. Ainsi, plus la quantité de Rhodamine est importante moins les rayons incidents interagissent avec l'environnement proche de la surface de la nanoparticule. Par diffusion de la lumière, les résultats indiquent qu'au fur et à mesure que le nombre de molécules greffées augmente, des agrégats se forment. Ceci peut être dû à la présence des cycles conjugués sur le fluorophore générant des interactions attractives $\pi\text{-}\pi$ aromatiques. Cette augmentation de l'état d'agrégation se traduit sur les mesures MIAplex par une diminution de l'intensité du signal, Figure 25B.

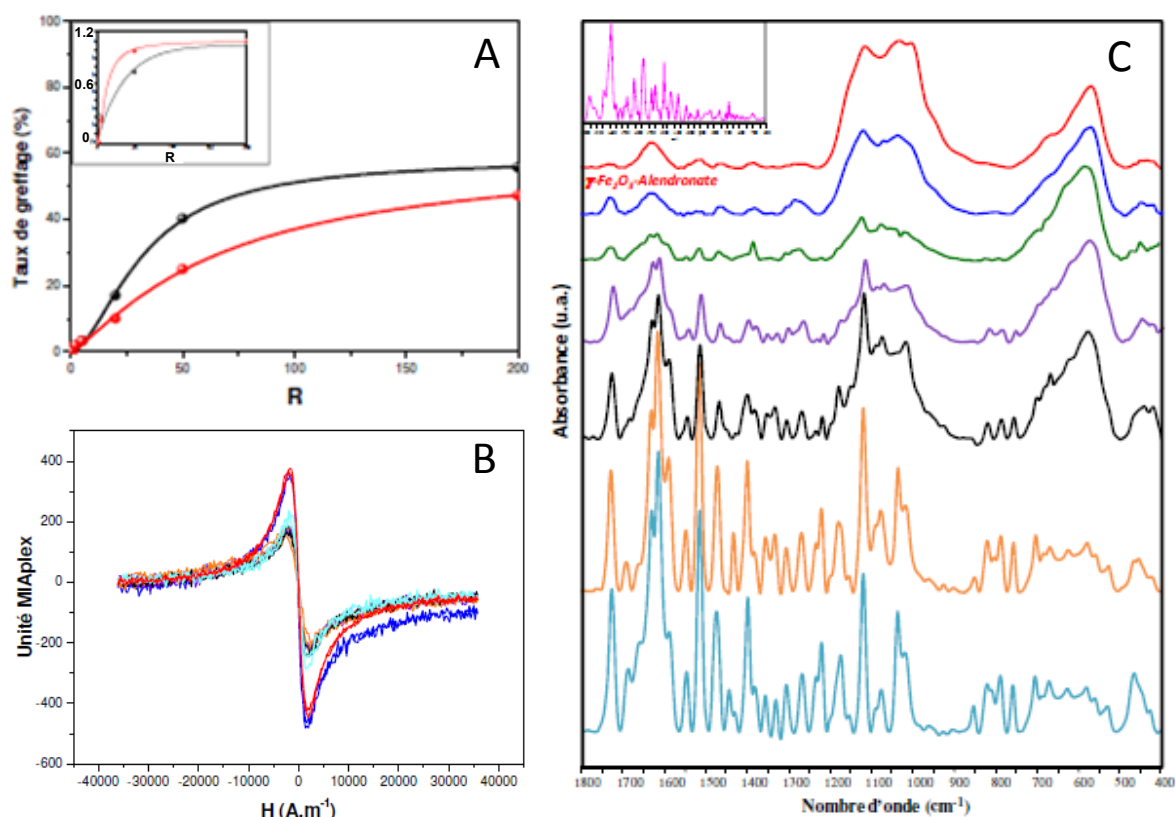


Figure 25 : (A) Comparaison des résultats obtenus sous énergie micro-onde et en insert sous énergie thermique normale (quantification UV (courbe noire) et fluorescence (courbe rouge) (B) Signatures MIAplex® et (C) Spectres infrarouges des nanocristaux $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Alendronate}$ (rouge), et $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Alendronate-Rhodamine}$ synthétisés sous micro-onde à différents ratios R=1 (Bleu), R=2(Vert) R=5(Violet), R=20 (Noire), R=50 (Orange), R=200 (Bleu clair) (Insert: Rhodamine B libre)

Une deuxième étude, réalisée par Guenin *et al.*⁹⁸, montre l'influence des micro-ondes sur le couplage par « click chemistry » d'un fluorophore, la Rhodamine- N_3 , sur une nanoplateforme $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ fonctionnalisée par des molécules présentant une fonction alcyne terminale. Les caractérisations par infrarouge et fluorescence montrent que le rendement de la réaction de Huisgen a été amélioré sous micro-ondes, Figure 26.

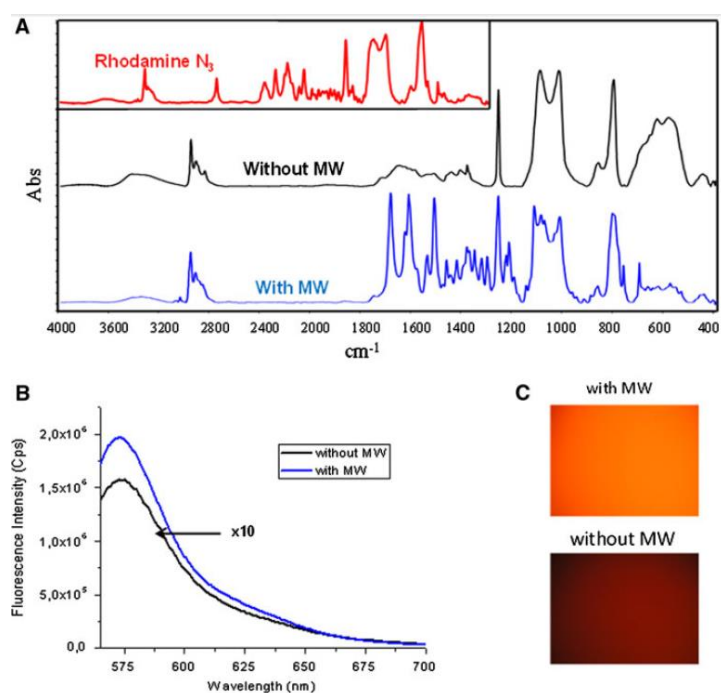


Figure 26 : Comparaison (A) des spectres infrarouges, (B) des spectres ($\lambda_{\text{exc}}=573\text{nm}$) et (C) images de fluorescence des nanoparticules $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Rhodamine obtenus par « chimie click » avec et sans l'utilisation des micro-ondes

En conclusion de ce chapitre, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ apparaissent comme une cible pertinente pour cibler l'angiogenèse. L'élaboration d'agents de contrastes spécifiques de ces intégrines présente donc un intérêt majeur. Ainsi, ce travail de thèse porte sur la conception d'agents bimodaux fluorescence/IRM spécifiques de l'angiogenèse, ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$.

Références bibliographiques

1. L. M. Sherwood, E. E. Parris, and J. Folkman, *New Engl. J. Med.*, 1971, **285**, 1182–1186.
2. J. S. Flier, L. H. Underhill, and J. Folkman, *New Eng. J. Med.*, 1995, **333**, 1757–1763.
3. C. Francavilla, L. Maddaluno, and U. Cavallaro, in *Semin. Cancer Biol.*, 2009, vol. 19, pp. 298–309.
4. P. Carmeliet, *Nat. Med.*, 2000, **6**, 389.
5. M. Ziche, S. Donnini, and L. Morbidelli, *Curr. Drug Targets*, 2004, **5**, 485–493.
6. D. M. McDonald and P. L. Choyke, *Nat. Med.*, 2003, **9**, 713–725.
7. R. O. Hynes, *Cell*, 2002, **110**, 673–687.
8. R. Haubner, D. Finsinger, and H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1997, **36**, 1374–1389.
9. Z. Liu, F. Wang, and X. Chen, *Drug Develop. Res.*, 2008, **69**, 329–339.
10. F. G. Giancotti, *Science*, 1999, **285**, 1028–1033.
11. W. L. Rust, S. W. Carper, and G. E. Plopper, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2002, **2**, 124–130.
12. J.-P. Xiong, *Science*, 2001, **294**, 339–345.
13. F. Danhier, A. Le Breton, and V. Preat, *Mol. Pharmaceutics*, 2012, **11**, 2961–2973.
14. B.-H. Luo, C. V. Carman, and T. A. Springer, *Annual review of immunology*, 2007, **25**, 619.
15. J. Takagi and T. A. Springer, *Immunol. Rev.*, 2002, **186**, 141–163.
16. J. D. Humphries, A. Byron, and M. J. Humphries, *J Cell Sci*, 2006, **119**, 3901–3903.
17. K. Hodivala-Dilke, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2008, **20**, 514–519.
18. J. S. Desgrosellier and D. A. Cheresh, *Nat. Rev. Cancer*, 2010, **10**, 9–22.
19. E. Ruoslahti and M. Pierschbacher, *Science*, 1987, **238**, 491–497.
20. J. Takagi, *Biochem. Soc. Trans.*, 2004, **32**, 403–406.
21. C. Mas-Moruno, F. Rechenmacher, and H. Kessler, *Anticancer Agents Med Chem*, 2010, **10**, 753–768.
22. R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, and H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 7461–7472.
23. K. Temming, R. M. Schiffelers, G. Molema, and R. J. Kok, *Drug Resist. Update.*, 2005, **8**, 381–402.
24. M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, and H. Kessler, *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 3033–3040.
25. E. Koivunen, B. Wang, and E. Ruoslahti, *Nat. Biotechnol.*, 1995, **13**, 265–270.
26. N. Assa-Munt, X. Jia, P. Laakkonen, and E. Ruoslahti, *Biochemistry*, 2001, **40**, 2373–2378.
27. P. Hölig, M. Bach, T. Völkel, T. Nahde, S. Hoffmann, R. Müller, and R. E. Kontermann, *Prot. Eng. Des. Sel.*, 2004, **17**, 433–441.
28. M. E. Duggan, L. T. Duong, J. E. Fisher, T. G. Hamill, W. F. Hoffman, J. R. Huff, N. C. Ihle, C.-T. Leu, R. M. Nagy, J. J. Perkins, S. B. Rodan, G. Wesolowski, D. B. Whitman, A. E. Zartman, G. A. Rodan, and G. D. Hartman, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 3736–3745.
29. R. J. Kok, A. J. Schraa, E. J. Bos, H. E. Moorlag, S. A. Ásgeirsdóttir, M. Everts, D. K. F. Meijer, and G. Molema, *Bioconjugate Chem.*, 2002, **13**, 128–135.
30. D. Boturny, J.-L. Coll, E. Garanger, M.-C. Favrot, and P. Dumy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 5730–5739.
31. D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, *Nat. Nanotechnol.*, 2007, **2**, 751–760.
32. R. Weissleder and M. J. Pittet, *Nature*, 2008, **452**, 580–589.
33. S. J. Zhang and J. C. Wu, *J Nucl Med*, 2007, **48**, 1916–1919.
34. S. R. Cherry, *Semin Nucl Med*, 2009, **39**, 348–353.
35. M. A. Pysz, S. S. Gambhir, and J. K. Willmann, *Clin. Radiol.*, 2010, **65**, 500–516.
36. C. Foerg and H. P. Merkle, *J. Pharm. Sci.*, 2007, **97**, 144–162.
37. F. Heitz, M. C. Morris, and G. Divita, *Brit. J. Pharmacol.*, 2009, **157**, 195–206.

38. I. Martín, M. Teixidó, and E. Giralt, *Pharmaceuticals*, 2010, **3**, 1456–1490.
39. S. Lucie, G. Elisabeth, F. Stéphanie, S. Guy, H. Amandine, A.-R. Corinne, B. Didier, S. Catherine, G. Alexeï, D. Pascal, and C. Jean-Luc, *Mol. Ther.*, 2009, **17**, 837–843.
40. E. Garanger, D. Boturn, Z. Jin, P. Dumy, M. Favrot, and J. Coll, *Mol. Ther.*, 2005, **12**, 1168–1175.
41. L. Sancey, V. Ardisson, L. M. Riou, M. Ahmadi, D. Marti-Batlle, D. Boturn, P. Dumy, D. Fagret, C. Ghezzi, and J.-P. Vuillez, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.*, 2007, **34**, 2037–2047.
42. M. Ahmadi, L. Sancey, A. Briat, L. Riou, D. Boturn, P. Dumy, D. Fagret, C. Ghezzi, and J.-P. Vuillez, *Cancer Biother. Radio.*, 2008, **23**, 691–700.
43. V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005, **4**, 145–160.
44. A. Sharma and U. S. Sharma, *Int. J. Pharm.*, 1997, **154**, 123–140.
45. W. J. M. Mulder, G. J. Strijkers, J. W. Habets, E. J. W. Bleeker, D. W. J. van der Schaft, G. Storm, G. A. Koning, A. W. Griffioen, and K. Nicolay, *FASEB J*, 2005, **19**, 2008–2010.
46. G. J. Strijkers, E. Kluza, G. A. F. Tilborg, D. W. J. Schaft, A. W. Griffioen, W. J. M. Mulder, and K. Nicolay, *Angiogenesis*, 2010, **13**, 161–173.
47. W. J. M. Mulder, D. W. J. van der Schaft, P. A. I. Hautvast, G. J. Strijkers, G. A. Koning, G. Storm, K. H. Mayo, A. W. Griffioen, and K. Nicolay, *FASEB J*, 2007, **21**, 378–383.
48. R. Solaro, F. Chiellini, and A. Battisti, *Materials*, 2010, **3**, 1928–1980.
49. J. H. Park, S. Lee, J.-H. Kim, K. Park, K. Kim, and I. C. Kwon, *Prog. Polym. Sci.*, 2008, **33**, 113–137.
50. B. Nagavarma, K. Y. Hemant, A. Ayaz, L. Vasudha, and H. Shivakumar, *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 2012, **5**, 16–23.
51. A. Mitra, A. Nan, J. C. Papadimitriou, H. Ghandehari, and B. R. Line, *Nucl. Med. Biol.*, 2006, **33**, 43–52.
52. C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. Fréchet, and F. C. Szoka, *Nat. Biotechnol.*, 2005, **23**, 1517–1526.
53. C. A. Boswell, P. K. Eck, C. A. S. Regino, M. Bernardo, K. J. Wong, D. E. Milenic, P. L. Choyke, and M. W. Brechbiel, *Mol. Pharmaceutics*, 2008, **5**, 527–539.
54. C. Oerlemans, W. Bult, M. Bos, G. Storm, J. F. W. Nijsen, and W. E. Hennink, *Pharm. Res.*, 2010, **27**, 2569–2589.
55. N. Nasonkula, E. Bey, J. Ren, H. Ai, C. Khemtong, J. S. Guthi, S.-F. Chin, A. D. Sherry, D. A. Boothman, and J. Gao, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 2427–2430.
56. E. C. Cho, C. Glaus, J. Chen, M. J. Welch, and Y. Xia, *Trends Mol Med*, 2010, **16**, 561–573.
57. K. Park, S. Lee, E. Kang, K. Kim, K. Choi, and I. C. Kwon, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 1553–1566.
58. T. Torchynska and Y. Vorobiev, in *Semiconductor II-VI Quantum Dots with Interface States and Their Biomedical Applications*, ed. G. Gargiulo, 2011.
59. H. M. E. Azzazy, M. M. H. Mansour, and S. C. Kazmierczak, *Clinical Biochemistry*, 2007, **40**, 917–927.
60. W. Cai, D.-W. Shin, K. Chen, O. Gheysens, Q. Cao, S. X. Wang, S. S. Gambhir, and X. Chen, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 669–676.
61. Z. P. Xu, Q. H. Zeng, G. Q. Lu, and A. B. Yu, *Chem. Eng. Sci.*, 2006, **61**, 1027–1040.
62. S. Link and M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 4212–4217.
63. X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, *Nanomedicine*, 2007, **2**, 681–693.
64. J. E. Gagner, M. D. Lopez, J. S. Dordick, and R. W. Siegel, *Biomaterials*, 2011, **32**, 7241–7252.
65. E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, and M. A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2740.
66. J. Choi, J. Yang, J. Park, E. Kim, J.-S. Suh, Y.-M. Huh, and S. Haam, *Adv. Funct. Mater.*, 2011, **21**, 1082–1088.

67. A. Elhissi, W. Ahmed, I. U. Hassan, V. Dhanak, and A. D'Emanuele, *J. Drug Deliv.*, 2011, **2012**.
68. C. Richard, Q. le M. de Chermont, and D. Scherman, *Tumori*, 2008, **94**, 264.
69. B.-T. Doan, J. Seguin, M. Breton, R. L. Beherec, M. Bessodes, J. A. Rodríguez-Manzo, F. Banhart, J.-C. Beloeil, D. Scherman, and C. Richard, *Contrast Media Mol. I.*, 2012, **7**, 153–159.
70. M. Adeli, R. Soleyman, Z. Beiranvand, and F. Madani, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 5231–56.
71. A. De La Zerda, C. Zavaleta, S. Keren, S. Vaithilingam, S. Bodapati, Z. Liu, J. Levi, B. R. Smith, T.-J. Ma, and O. Oralkan, *Nat. Nanotechnol.*, 2008, **3**, 557–562.
72. Z. Liu, X. Sun, N. Nakayama-Ratchford, and H. Dai, *ACS Nano*, 2007, **1**, 50–56.
73. J.-P. Fortin, C. Wilhelm, J. Servais, C. Ménager, J.-C. Bacri, and F. Gazeau, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 2628–2635.
74. M. Lévy, C. Wilhelm, J.-M. Siaugue, O. Horner, J.-C. Bacri, and F. Gazeau, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2008, **20**, 204133.
75. C. Wilhelm, J.-P. Fortin, and F. Gazeau, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2007, **7**, 2933–2937.
76. M. Di Marco, C. Sadun, M. Port, I. Guilbert, P. Couvreur, and C. Dubernet, *Int. J. Nanomed.*, 2007, **2**, 609.
77. J. E. Rosen, L. Chan, D.-B. Shieh, and F. X. Gu, *Nanomedicine*, 2012, **8**, 275–290.
78. X. Yang, H. Hong, J. J. Grailer, I. J. Rowland, A. Javadi, S. A. Hurley, Y. Xiao, Y. Yang, Y. Zhang, R. J. Nickles, W. Cai, D. A. Steeber, and S. Gong, *Biomaterials*, 2011, **32**, 4151–4160.
79. D. Arosio, C. Casagrande, and L. Manzoni, *Curr. Med. Chem.*, 2012, **19**, 3128–3151.
80. S. A. Wickline, A. M. Neubauer, P. Winter, S. Caruthers, and G. Lanza, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006, **26**, 435–441.
81. C. Burtea, S. Laurent, O. Murariu, D. Rattat, G. Toubeau, A. Verbruggen, D. Vanstherem, L. Vander Elst, and R. N. Muller, *Cardiovasc. Res.*, 2008, **78**, 148–157.
82. J. Haukkala, I. Laitinen, P. Luoto, P. Iveson, I. Wilson, H. Karlsen, A. Cuthbertson, J. Laine, P. Leppänen, and S. Ylä-Herttula, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.*, 2009, **36**, 2058–2067.
83. P. M. Winter, A. M. Morawski, S. D. Caruthers, R. W. Fuhrhop, H. Zhang, T. A. Williams, J. S. Allen, E. K. Lacy, J. D. Robertson, and G. M. Lanza, *Circulation*, 2003, **108**, 2270–2274.
84. P. M. Winter, A. M. Neubauer, S. D. Caruthers, T. D. Harris, J. D. Robertson, T. A. Williams, A. H. Schmieder, G. Hu, J. S. Allen, and E. K. Lacy, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006, **26**, 2103–2109.
85. R. Khurana, M. Simons, J. F. Martin, and I. C. Zachary, *Circulation*, 2005, **112**, 1813–1824.
86. J. M. Chalker, G. J. L. Bernardes, and B. G. Davis, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 730–741.
87. D. Sehgal and I. K. Vijay, *Anal. Biochem.*, 1994, **218**, 87–91.
88. J. V. Staros, R. W. Wright, and D. M. Swingle, *Anal. Biochem.*, 1986, **156**, 220–222.
89. H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 2004–2021.
90. R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1963, **2**, 565–598.
91. R. Hoogenboom, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**, 3415–3417.
92. V. D. Bock, H. Hiemstra, and J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, **2006**, 51–68.
93. A. Barge, S. Tagliapietra, A. Binello, and G. Cravotto, *Curr. Org. Chem.*, 2011, **15**, 189–203.
94. F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, and V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 210–216.
95. C. E. Hoyle, A. B. Lowe, and C. N. Bowman, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1355.
96. S. Shi and J.-Y. Hwang, *J. Min. Mater. Charact. Eng.*, 2003, **2**, 101–110.
97. F. Benyettou, E. Guenin, Y. Lalatonne, and L. Motte, *Nanotechnology*, 2011, **22**, 055102.
98. E. Guénin, J. Hardouin, Y. Lalatonne, and L. Motte, *J. Nanopart. Res.*, 2012, **14**.

Chapitre 2

Fonctionnalisation de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ pour le ciblage et l'imagerie de l'angiogenèse

Dans le chapitre précédent, nous avons constaté l'utilité des vecteurs porteurs de séquences RGD pour cibler l'angiogénèse. Les nanoparticules d'oxyde de fer font partie intégrante de ces systèmes. Ainsi, dans ce chapitre, nous décrirons chaque étape de l'élaboration de ces nanoplateformes. Tout d'abord, la synthèse de nano-complexes $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ainsi que leur fonctionnalisation de surface par un agent complexant, l'acide caféique, seront détaillées. Puis, diverses techniques d'analyse seront utilisées pour les caractériser. Les fonctions réactives de type acide carboxylique présentes à la surface externe de ces nanoplateformes serviront aux couplages de diverses biomolécules : fluorophore, chaînes PEG, séquence RGD, par chimie des carbodiimides. Ces étapes préliminaires permettront de mettre au point des nanoplateformes multimodales utilisables pour la double imagerie (fluorescence et IRM) et ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$. Leur stabilité dans le sérum sera évaluée et leur potentiel en tant qu'agent de contraste IRM sera vérifié. Leur affinité vis-à-vis des intégrines sera étudiée par BIAcore et par dosage de liaisons sur support solide en présence d'un compétiteur radioactif. La dernière partie de ce chapitre sera consacrée aux peptidomimétiques.

I. Synthèse, fonctionnalisation de la surface et caractérisation des nanoparticules de maghémite

I. 1. Synthèse des nanoparticules $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ en système micellaire direct

Les nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sont synthétisées en système micellaire direct. Cette méthode de synthèse repose sur l'utilisation d'un tensio-actif, le di-dodécylsulfate de fer ou laurylsulfate de fer II, $\text{Fe}(\text{LS})_2$. Ce dernier est synthétisé à partir du laurylsulfate de sodium (NaLS) qui est constitué d'une longue chaîne hydrocarbonée (partie hydrophobe) et d'une tête polaire anionique SO_3^- , le contre ion étant Na^+ . Le tensio-actif est ensuite obtenu par échange d'ions, c'est-à-dire que le contre ion Na^+ du NaLS est remplacé par le cation Fe^{2+} pour former $\text{Fe}(\text{LS})_2$. En milieu aqueux, les molécules s'associent pour former des micelles directes, au dessus d'une concentration micellaire dite critique ($\text{CMC} = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), et d'une certaine température dite de Kraft ($T_K = 28^\circ\text{C}$). Le cœur est ainsi constitué par les chaînes hydrocarbonées du tensio-actif et les ions Fe^{2+} sont complexés à la surface via les têtes polaires SO_3^- , Figure 1.

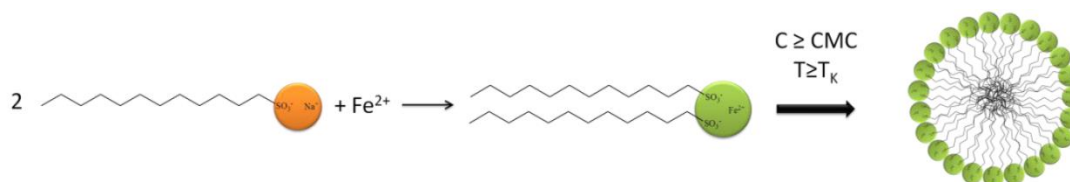


Figure 1 : Schéma de synthèse du laurylsulfate de fer II ($\text{Fe}(\text{LS})_2$)

L'ajout d'une base faible, la diméthylamine, induit la formation des nanoparticules d'oxyde de fer par oxydation ménagée des ions Fe^{2+} à la surface des micelles. La solution est agitée à $28,5^\circ\text{C}$ pendant deux heures. Par ajout d'un acide fort HCl (acide chlorhydrique) à 1 mol.L^{-1} , le potentiel de surface des nanocristaux est neutralisé, ce qui induit leur précipitation, Figure 2. Le précipité est isolé du surnageant à l'aide d'aimants et nettoyé plusieurs fois à pH 7.

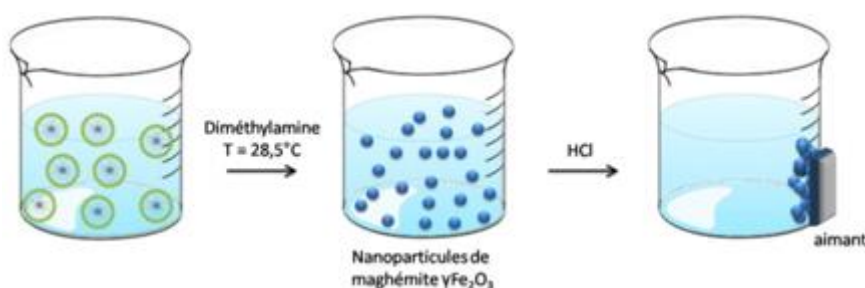


Figure 2 : Schéma de synthèse des nanoparticules de maghémite

La Figure 3 montre l'évolution du potentiel de surface et de la taille hydrodynamique des nanoparticules de maghémite en fonction du pH, obtenue par diffusion de la lumière (Annexe 2.3). Elles présentent un point isoélectrique (PIE) aux alentours de pH 6. En dessous et au dessus de cette valeur, les charges à la surface des nanoparticules sont respectivement positives et négatives. Ainsi pour des valeurs de pH inférieures à 5 et supérieures à 9.5, la présence des charges à la surface des nanoparticules induit des répulsions électrostatiques entre particules et conduit à la formation d'un ferrofluide stable.

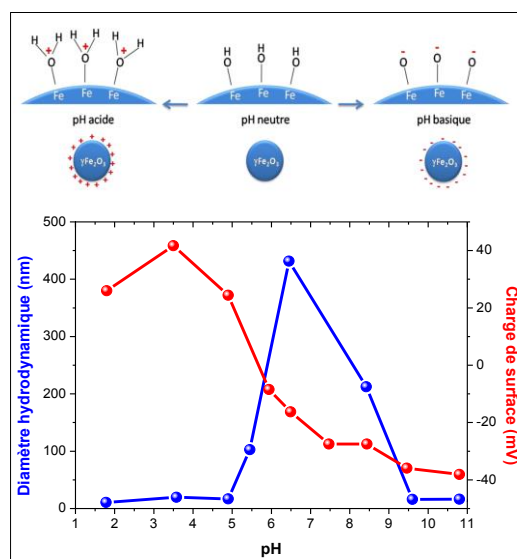


Figure 3 : Tailles hydrodynamiques et charges de surface des nanoparticules "nues" en fonction du pH mesurées par diffusion de la lumière (Nanosizer Malvern)

I. 2. Fonctionnalisation des nanoparticules $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

L'élaboration de nos nanoplateformes multimodales repose sur la stratégie suivante : les nanoparticules de maghémite précédemment synthétisées sont fonctionnalisées par une molécule bifonctionnelle. Cette dernière possède à la fois une fonction permettant la complexation sur les sites de surfaces des nanoparticules et une fonction réactive utilisée par la suite pour le couplage de biomolécules. Différentes fonctions complexantes de surface¹ sont utilisées, on pourra citer notamment les phosphates^{2,3}, les phosphonates⁴, les bisphosphonates⁵, les sulfonates⁶, les fonctions acides carboxyliques⁷, les citrates⁸ ou les fonctions catéchols⁹,... Ces fonctions présentent des interactions plus ou moins fortes vis-à-vis des oxydes de métaux. Dans cette étude, notre choix s'est porté sur l'utilisation de l'acide caféique, qui présente à la fois une fonction acide carboxylique et une fonction catéchole, Figure 4A.

L'acide caféique est un composé naturellement présent dans les plantes. Il appartient à la famille des substances humiques, qui jouent un rôle lors des processus de biodégradation et forme facilement des complexes avec les ions largement diffusés dans l'environnement. Il agit également en tant qu'inhibiteur de l'hépatocarcinome et est connu *in vitro* en tant qu'antioxydant.¹⁰ Cette molécule se compose de plusieurs charges avec des pKa de 4.4 pour la fonction carboxylique et de 8.6 et 11.5 pour les fonctions catéchols.¹¹ La fonction catéchole est décrite comme un complexant de l'élément fer par complexation bidentate des atomes de fer avec les deux atomes d'oxygène, Figure 4B.¹² Les acides carboxyliques peuvent

également être adsorbés sur les oxydes de métaux, cependant leurs interactions sont connues pour être relativement faibles, excepté pour les acides gras à longues chaînes.¹ Ainsi, dans notre cas, nous nous attendons à une complexation via les fonctions catéchols, ce qui sera vérifié par la suite.

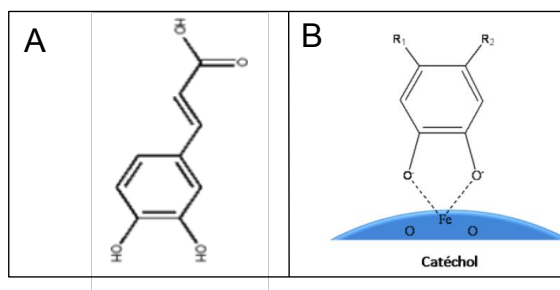


Figure 4 : (A) Acide caféique (CA) ; (B) Proposition de complexation de surface des nanoparticules via la fonction catéchol par complexation bidentate des atomes de fer avec les deux atomes d'oxygène¹²

La fonctionnalisation des nanoparticules est ainsi réalisée par adsorption de ligands. L'acide caféique est ajouté à la solution de nanoparticules à pH basique (pH 10). Le greffage est réalisé sous agitation magnétique à température ambiante pendant deux heures. Les nanocristaux sont ensuite séparés du surnageant par précipitation sur un aimant à pH acide (pH 2). L'opération est répétée cinq fois. Après les lavages, les nanoparticules « habillées » sont redispersées dans l'eau à pH physiologique, Figure 5. On obtient ainsi un ferrofluide stable à pH neutre, $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$.

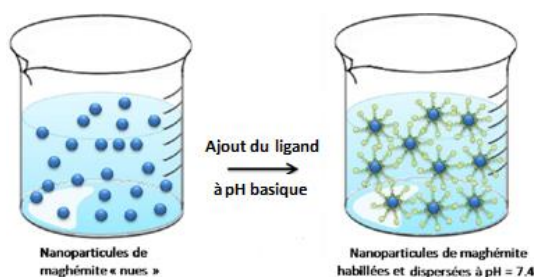


Figure 5 : Habillage des nanoparticules et obtention d'un ferrofluide stable $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ à pH physiologique

I. 3. Caractérisations physico-chimiques de la nanoplateforme

Différentes méthodes (cf Annexe 2) sont utilisées pour caractériser les nanoparticules et mettre ainsi en évidence leurs propriétés physico-chimiques telles que la taille cristalline (Microscopie électronique à transmission), la taille hydrodynamique (diffusion de la lumière), le potentiel de surface (potentiel Zeta), les propriétés de surface (spectroscopie infrarouge) et

les propriétés magnétiques (VSM, signature MIAplex®, IRM). Le nombre de molécules greffées à la surface est déterminé par analyse thermogravimétrique (ATG).

I. 3. 1. Evaluation de la taille par MET

La Microscopie électronique à transmission (MET), Annexe 2.1, donne accès à la morphologie, la taille cristalline et la distribution en taille. Un cliché MET des nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ est représenté Figure 6, et met en avant leur structure sphérique et un état plus ou moins aggloméré. La taille moyenne et la polydispersité déterminée en simulant une loi log-normale sur la distribution en taille, sont respectivement 9 nm et 0,2 ($w_0=1.8\text{nm}$).

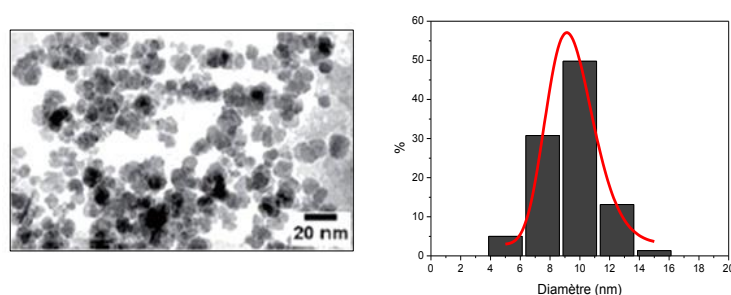


Figure 6 : Cliché MET des nanoparticules après greffage et distribution en taille

I. 3. 2. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge, Annexe 2.2, permet de confirmer la présence des ligands adsorbés à la surface de la nanoparticule. La Figure 7 présente les spectres infrarouges (pastilles KBr) du ligand et des nanoparticules avant et après fonctionnalisation de leur surface.

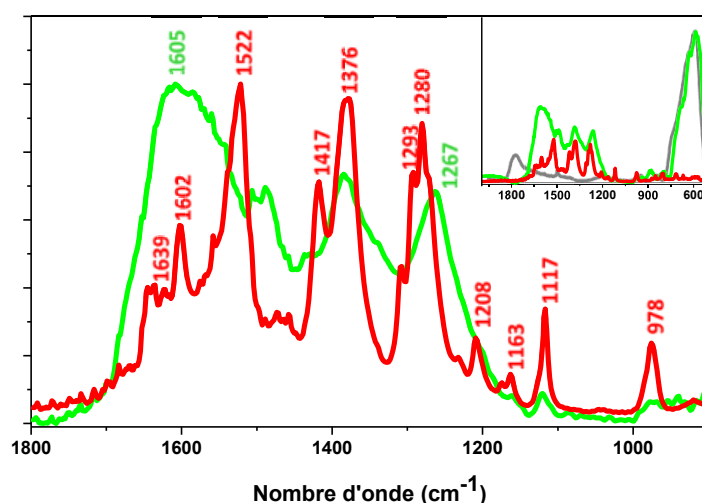


Figure 7 : Spectres infrarouges de l'acide caféique (en rouge), de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ (en vert) et en insert le spectre infrarouge de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ (en gris)

Le spectre infrarouge de l'acide caféique (spectre rouge) est caractérisé par différentes bandes de vibration : les bandes d'élongation C=C des alcènes à 1639 cm^{-1} , et des cycles aromatiques à $1602, 1522\text{ cm}^{-1}$, les bandes d'élongation du groupe phénolique C-OH à $1417, 1376, \text{ et } 978\text{ cm}^{-1}$ et de déformation à $1280, 1522, \text{ et } 1117\text{ cm}^{-1}$ et les bandes d'élongation et/ou de déformation du CO ou OH dans COOH à $1293, 1208 \text{ et } 1163\text{ cm}^{-1}$.^{13,14} Des changements sont observés après l'adsorption de l'acide caféique à la surface des nanoparticules (spectre vert) indiquant la complexation de surface du catéchol via les groupements phénoliques. Les différences les plus remarquables, en plus de l'apparition de la bande de vibration d'élongation Fe-O à 600 cm^{-1} (insert Figure 7) sont la disparition des bandes à 978 cm^{-1} , la diminution d'intensité de la bande à 1417 cm^{-1} et un déplacement de la bande à 1280 cm^{-1} vers les plus faibles nombre d'onde. Ces différentes bandes sont associées au groupe phénolique OH, participant à la complexation à la surface de la nanoparticule. Par ailleurs, la fonctionnalisation affecte également les bandes de vibration des cycles aromatiques (au dessus de 1400 cm^{-1}) dont la plus notable est l'apparition de la bande forte caractéristique de la cétone aromatique conjuguée à 1605 cm^{-1} , confirmant ainsi la complexation de manière bidentate du catéchol à la surface¹⁵, Figure 4B.

Des résultats similaires ont été obtenus sur des oxydes de métaux tels que TiO_2 , ou ZrO_2 , où leur surface avait été fonctionnalisée par divers ligands énediol.^{16,17}

I. 3. 3. Propriétés hydrodynamiques

Les mesures du potentiel de surface et de la taille hydrodynamique ont été réalisées sur les nanoparticules de maghémite après fonctionnalisation, Figure 8. Par comparaison avec les nanoparticules de maghémite, Figure 3, l'habillage des nanoparticules modifie leurs propriétés physicochimiques de surface, que ce soit au niveau du potentiel de charge nul qu'au niveau du domaine de stabilité en pH, ce qui atteste de l'efficacité du greffage des molécules à sa surface. Ainsi, le PIE est déplacé vers les bas pH (aux alentours de pH 2), et au-delà de cette valeur, la charge moyenne de surface est négative. Les mesures de tailles hydrodynamiques montrent que les nanoparticules « habillées » sont stables sur une gamme importante de pH, entre pH 4 et pH 11. Ainsi, à bas pH, les répulsions électrostatiques entre nanoparticules sont faibles voir nulles, les particules s'agrègent. Lorsque le pH augmente, les fonctions acides carboxyliques se déprotonent ($\text{pK}_a=4.4$) ce qui induit l'apparition de charges

négatives à la surface des particules. Ces interactions électrostatiques répulsives entre nanoparticules permettent d'obtenir une stabilité colloïdale à partir d'un pH de l'ordre de 4.

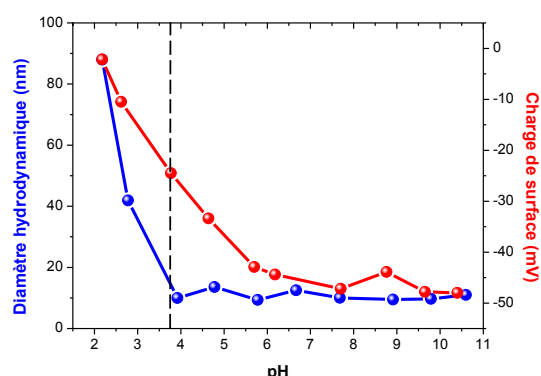


Figure 8 : Diamètre hydrodynamique et potentiel de surface en fonction du pH des nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$

Le potentiel Zeta et la taille hydrodynamique à pH neutre sont reportés dans le Tableau 1. On remarque que la taille hydrodynamique est très proche de la taille cristalline (9 nm), ce qui confirme un état d'agrégation faible et une stabilité colloïdale à pH physiologique.

D_h (nm)	14.2 PdI : 0.2
Zeta (mV)	-45 ± 5

Tableau 1: Taille hydrodynamique et potentiel Zeta à pH neutre de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$

I. 3. 4. Etude du comportement magnétique

Les courbes d'aimantation à température ambiante ont été mesurées sur un magnétomètre VSM (Vibrating Sample Magnetometer, Annexe 2.4) et en utilisant un lecteur magnétique le MIAplex®¹⁸ (Annexe 2.5). Rappelons que dans le régime de taille où nous travaillons, un comportement superparamagnétique est attendu à température ambiante. Le VSM mesure les cycles d'aimantation par application d'un champ de -2300 à +2300 kA/m avec une vitesse d'acquisition de l'ordre de 8 kA/s. Les mesures sont réalisées sur un échantillon sous forme de poudre (environ 2 mg) à une température de 298 K (25°C). Le MIAplex®, quant à lui, mesure un signal qui est proportionnel à la dérivée seconde de la courbe d'aimantation au voisinage du champ nul. Le cycle d'aimantation est enregistré sur une gamme de champ beaucoup plus étroite, de -15 à 15 kA/m, Figure 9. La mesure s'effectue sur 10 μL de ferrofluide (C_{Fe} pouvant varier de 0.2 à 0.02 M) à température ambiante. Ce dispositif de petite taille permet de travailler sur de petites quantités et sans utilisation d'un système de

refroidissement. De plus, la mesure MIAplex® (environ 1 min) est beaucoup plus rapide que celle du VSM (environ 30 min).

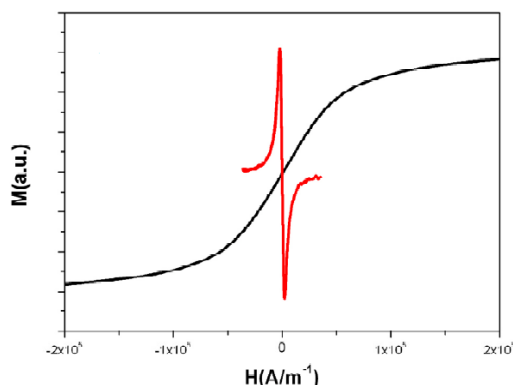


Figure 9 : Superposition de la courbe d'aimantation (noire) et de la signature MIAplex® (rouge)

Les signatures magnétiques (VSM et MIAplex®) des nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ sont représentées Figure 10 et attestent d'un comportement superparamagnétique. L'aimantation à saturation est de 48 emu/g, ce qui est inférieure à la valeur du matériau massif (80 emu/g)¹⁹ pour la maghémite. La raison de cette diminution peut être attribuée au désordre magnétique des spins des atomes de fer à la surface des particules.²⁰ Par ailleurs, la courbe ZFC/FC a été mesurée à 100 Oe de 50 à 300 K à l'aide du VSM et indique une température de blocage T_b d'environ 230 K. Cette température observée est relativement forte, comparée aux valeurs reportées dans la littérature.²¹ Ceci peut être dû à des fortes interactions magnétiques entre nanoparticules (lié à la faible longueur du ligand de surface) ainsi qu'à la distribution en taille des nanoparticules, entraînant l'élargissement de la courbe.²²

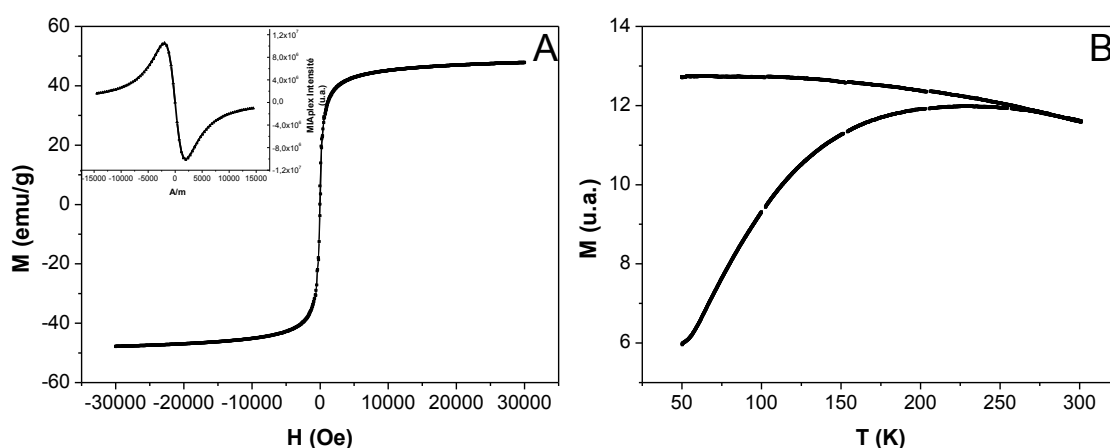


Figure 10 : (A) Signatures VSM (sous forme de poudre) et MIAplex® (normalisée / mg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$); (B) Courbe ZFC/FC (sous forme de poudre) des nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$

I. 3. 5. IRM

De par leurs propriétés superparamagnétiques, les nanoparticules d'oxyde de fer sont utilisées comme agent de contraste T2, générant un hyposignal dans la zone d'accumulation. Des mesures de temps de relaxation T1 et T2 ont été effectuées sur un IRM clinique 1.5 T, à température ambiante et sur une gamme de concentration allant de 0.076 mM à 0.31 mM en fer. Les acquisitions T1 et T2 ont été réalisées respectivement à l'aide d'une séquence inversion-récupération et d'une séquence d'écho de spin (Annexe 2.6). L'intensité de signal des images T1 et T2 change en augmentant la concentration en nanoparticules, Figure 11, indiquant que les nanoparticules synthétisées génèrent un contraste IRM. Par ailleurs, l'inverse des temps de relaxation varie linéairement avec la concentration en fer. Ainsi les relaxivités longitudinale r1 et transverse r2 peuvent être déduites de la pente de cette droite, Figure 11 et sont respectivement de $7.4 \pm 0.6 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et $186 \pm 5 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Le ratio élevé r2/r1, égal à 25, suggère une diminution considérable du signal sur les images T2 et démontre le potentiel de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ en tant qu'agent de contraste T2. Ce ratio est supérieur à celui des agents de contraste clinique, l'Endorem ou le Resovist, utilisés dans le cadre de l'exploration des pathologies tumorales hépatiques, Tableau 2.^{23,24}

Nom (Entreprise)	Agent de surface	Taille cristal (nm)	D _h (nm)	r1 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	r2 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	r2/r1
Endorem (Guerbet)	Dextran T10 (10 kDa)	5-6	120-180	10.1	120	11.9
Resovist (Schering)	Carboxy-dextran (1.8 kDa)	4	60	9.7	189	19.5

Tableau 2 : Agent de surface, diamètre hydrodynamique, relaxivités et ratio r2/r1 des agents de contraste clinique Endorem et Resovist²⁴

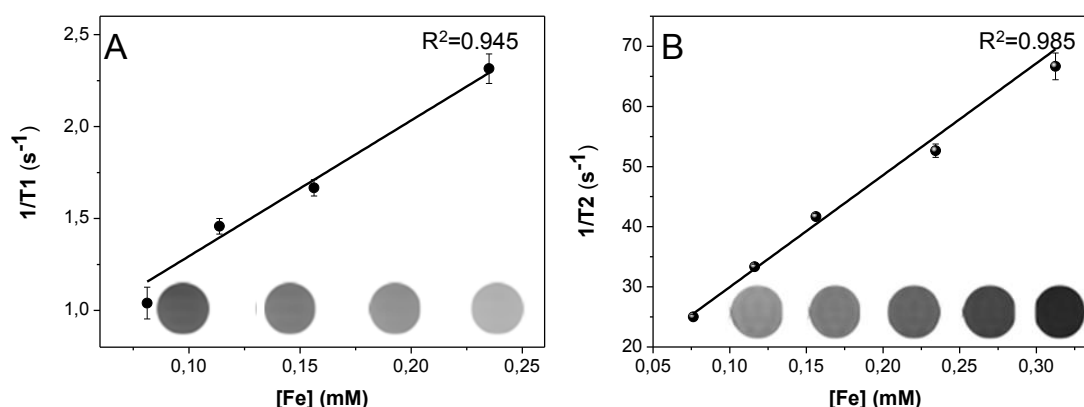


Figure 11 : (A) Images T1 de la solution de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ à $C_{\text{Fe}} = 0.076 ; 0.116 ; 0.156 ; 0.235 \text{ mM}$ (TR = 2000 ms, TE=16 ms, TI=50, 100, 200, 300, 450, 600, 750, 900, 1100, 1500, 1800 ms) et mesure de la relaxivité r1 (B) Images T2 de la solution de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ à $C_{\text{Fe}} = 0.076 ; 0.116 ; 0.156 ; 0.235 ; 0.31 \text{ mM}$ (TR=2000 ms, TE=20 ms) et mesure de la relaxivité r2

I. 3. 6. Quantification des ligands adsorbés

La détermination du nombre de ligands adsorbés à la surface des nanoparticules a été réalisée par analyse thermogravimétrique (ATG), Annexe 2.7. L'ATG permet de mesurer la masse d'un échantillon soumis à une variation linéaire de température. Un nombre moyen de 1100 acides caféiques par nanoparticules est déduit de la courbe ATG, Figure 12, correspondant à une surface de 23.1 \AA^2 occupée par chaque ligand. Il est à noter qu'une surface similaire a été obtenue en modifiant la surface de particules d'anatase avec des ligands de type dopamine.²⁵

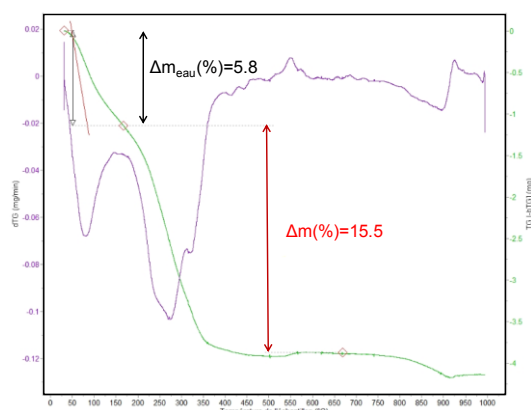


Figure 12 : Courbe ATG (verte) et dérivée (violette) de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$

II. Elaboration de nanoplateformes multimodales

Les nanocomplexes d'oxyde de fer fonctionnalisés en surface par l'acide caféique ont par la suite été utilisés pour le couplage de fluorophores (pour accéder à la double imagerie IRM et fluorescence), de chaînes PEG (pour accroître le temps de rétention dans le corps ou servir de « spacer »), ou de molécules reconnaissant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (cycloRGD ou peptidomimétiques). Toutes ces molécules présentent une fonction amine nécessaire pour le couplage par chimie des carbodiimides (cf mécanisme réactionnel dans le chapitre 1). Le but final étant l'élaboration de nanoplateformes multimodales, notre approche a d'abord été d'étudier chaque couplage séparément puis les diverses combinaisons possibles. Par ailleurs, l'apport des micro-ondes a été vérifié lors du couplage de fluorophores et sera utilisé par la suite pour le couplage des autres molécules (PEG et cycloRGD).

II. 1. Protocole de couplage

Le couplage de la molécule d'intérêt présentant une fonction amine sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ par la chimie des carbodiimides (cf chapitre 1), Figure 13, est réalisé dans l'eau selon une procédure en deux étapes. Tout d'abord, les fonctions acides carboxyliques présentes à la surface des nanoparticules sont activées en utilisant un mélange d'EDC et de NHS (5 équivalents par rapport aux fonctions acides carboxyliques) à pH 4. Les nanoparticules sont ensuite précipitées sur aimant et le surnageant est éliminé, ce qui permet d'éliminer l'excès d'EDC/NHS. La seconde étape consiste à faire réagir la fonction amine présente sur la molécule d'intérêt avec la fonction acide carboxylique activée. Pour cela, les nanoparticules sont dispersées dans l'eau à pH 10 avec de la *N,N*-diisopropyléthylamine. La molécule d'intérêt est dissoute dans l'eau et est ajoutée à la solution de nanoparticules. Une fois le couplage terminé, des lavages sont effectués à pH 2 afin d'éliminer les molécules qui n'ont pas réagi. Les nanoparticules ainsi modifiées sont redispersées dans l'eau à pH physiologique et les diverses caractérisations sont effectuées.

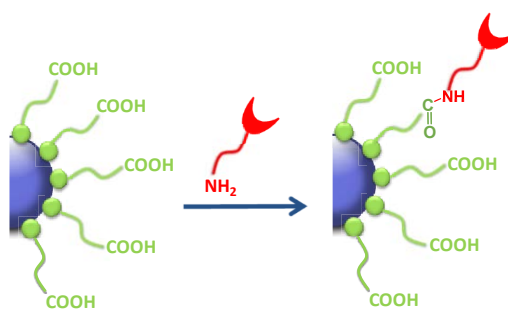


Figure 13 : Couplage sur la nanoplateforme par chimie des carbodiimides

Lors du couplage du fluorophore, les conditions opératoires ont été optimisées en jouant sur deux paramètres : l'excès de fonctions amines (de la molécule d'intérêt) par rapport aux fonctions acides carboxyliques (ratio R), et la source d'énergie : la voie classique, c'est-à-dire une activation pendant deux heures à température ambiante et le couplage pendant une nuit, et la voie énergétique, où les deux étapes sont réalisées sous énergie micro-onde. Pour les autres couplages (PEG, cycloRGD), uniquement l'effet du ratio R a été étudié, puisque tous ont été réalisés en tirant profit de l'usage des micro-ondes.

Les conditions opératoires sous micro-ondes sont présentées dans le Tableau 3. La température maximale a été abaissée pour le couplage des peptides afin de ne pas altérer leur structure.

	Greffage (Fluorophores, PEG)	Greffage (Peptides)
Montée en température	\nearrow 95 °C en 2 min	\nearrow 65°C en 1 min
Stabilisation	8 min	3 min
Refroidissement	\searrow 55°C	\searrow 55°C
Nombre de cycle	1	3

Tableau 3 : Protocole de greffage sous énergie micro-onde

II. 2. Nanoplateformes bimodales IRM/fluorescence

II. 2. 1. Choix du fluorophore

Les fluorophores organiques sont essentiellement des molécules aromatiques, présentant un système d'électrons π fortement délocalisés leur conférant des propriétés de fluorescence dans la gamme visible. Ils possèdent des spectres d'absorption et d'émission présentant des bandes larges, et des maxima d'absorption et d'émission peu éloignés. L'intérêt du couplage d'un fluorophore sur la nanoplateforme $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ est de pouvoir accéder à la double imagerie : IRM (grâce au cœur des nanoparticules superparamagnétique) et fluorescence (grâce au colorant). En effet, un important défi pour la nanomédecine est le développement d'agents d'imagerie médicale multimodaux qui pourraient être utilisés pour l'IRM, pour la quantification des niveaux d'expression des intégrines $\alpha_v\beta_3$ avant et pendant une thérapie anti-angiogénique ou seraient capables d'assister le geste chirurgical, lors de l'exérèse d'une tumeur, en la ciblant à l'aide de systèmes de mesures dans le proche infrarouge.

Dans un premier temps, le choix s'est donc porté sur un fluorophore proche infrarouge, l' amino FluoProbes® (Interchim), qui possède une longueur d'onde d'émission à 750 nm. Cependant, une dégradation des propriétés optiques en fonction du temps et du pH a été observée. C'est pourquoi, nous avons opté pour un fluorophore modèle, qui présente une stabilité plus importante, un dérivé de la Rhodamine présentant une fonction amine, la Rhodamine 123 (R123), Figure 14. Il présente une absorption caractéristique à 500 nm et une émission de fluorescence localisée à 522 nm.

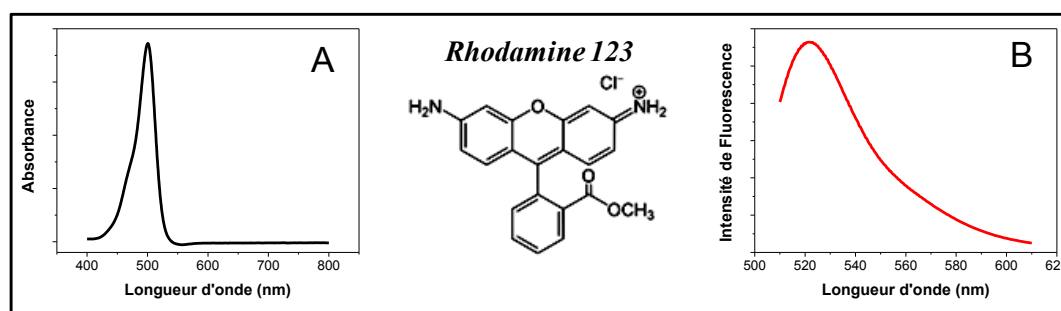


Figure 14 : Spectres (A) d'absorption et de (B) fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) de la Rhodamine 123

II. 2. 2. Apport des micro-ondes

Une étude préliminaire sur l'influence des micro-ondes sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ a été réalisée. Le Tableau 4 et la Figure 15 montrent l'invariance des propriétés hydrodynamiques (taille hydrodynamique et potentiel de surface) et magnétiques (signatures MIAplex). Ainsi l'utilisation des micro-ondes n'endommage pas la nanoplateforme.

Avant MW	$D_h \text{ (nm)}$	14.2 PdI : 0.2
	Zeta (mV)	-45 ± 5
Après MW	$D_h \text{ (nm)}$	14.0 PdI : 0.2
	Zeta (mV)	-45 ± 7

Tableau 4 : Etude de l'influence de l'énergie micro-onde sur les propriétés hydrodynamiques

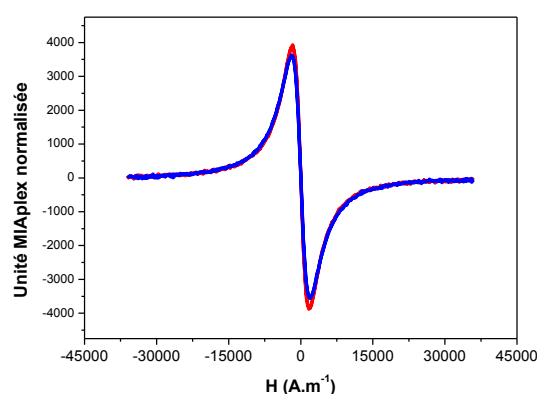


Figure 15 : Signatures MIAplex® (normalisées / mg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) Etude de l'influence de l'énergie micro-onde sur les propriétés magnétiques (Signatures MIAplex® normalisées / mg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ avant (en rouge) et après (en bleu) micro-onde

Le couplage de la Rhodamine R123 sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ a ainsi été réalisé pour différents ratios ($R=2$ et $R=20$) avec et sans l'utilisation de micro-ondes. Les nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA-R123}$ sont caractérisées par différentes méthodes spectroscopiques (infrarouge, UV, fluorescence), par diffusion de la lumière et par MIAplex.

L'évolution du rayon hydrodynamique et du potentiel de surface en fonction du rapport R a été étudiée et les résultats sont présentés dans le Tableau 5. Le potentiel de surface reste stable, cependant une augmentation de la taille hydrodynamique est observée. Cette évolution indique d'un point de vue qualitatif que le nombre de Rhodamines couplée à la surface augmente avec le rapport R. Benyettou *et al.*²⁶ avait formulé l'hypothèse qu'au fur et à mesure que le nombre de molécules greffées augmente, des agrégats se forment à cause des interactions attractives de type π - π aromatiques entre les fluorophores à la surface des nanoparticules. De plus, le fait de coupler ces molécules amphiphiles, composées de cycles aromatiques hydrophobes substitués par des fonctions polaires hydrophiles, a tendance à déséquilibrer la balance hydrophile hydrophobe, constituant une source de déstabilisation.

R	D_h (nm)	Pdl	Zeta (mV)
0	14.2	0.2	-45±5
2	16.5	0.3	-45±6
20	24.2	0.4	-44±5
2 MW	20.7	0.3	-41±7
20 MW	32.2	0.3	-41±10

Tableau 5 : Etude de l'évolution des propriétés hydrodynamiques en fonction du rapport R

Les spectres infrarouges des nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -R123 et le fluorophore seul, sont présentés Figure 16. Les spectres infrarouges pour un ratio R=2 et R=20 à température ambiante étant similaires à celui du ratio R=2 MW n'ont pas été représentés sur la figure. La signature de la Rhodamine 123 (spectre rose) est caractérisée par une bande à 1710 cm^{-1} correspondant à la vibration de valence $\nu\text{C=O}$ de la fonction ester et par une série de bandes d'absorption vibrationnelle des cycles aromatiques situés entre 1400 et 1650 cm^{-1} , Tableau 6. Pour les ratios R=2, 2 MW et 20, on retrouve les bandes caractéristiques de l'acide caféique (entre 1265 et 1610 cm^{-1}). Pour un ratio R=20 MW, des changements notables sont observés, notamment dans la région 1400 - 1800 cm^{-1} . Les bandes caractéristiques de la Rhodamine 123 sont déplacées vers les plus grands nombres d'ondes, Tableau 6, et on remarque l'apparition d'une nouvelle bande à 1634 cm^{-1} caractéristique de la vibration de valence $\nu\text{C=O}$ des liaisons amides, ce qui tend à prouver que la Rhodamine 123 a bien été couplée de manière covalente. Par ailleurs, une diminution progressive, avec le rapport R, de la bande de vibration Fer-Oxygène (600 cm^{-1}) est observée. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par

Benyettou *et al.*,²⁶ lors du couplage de la Rhodamine B sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ fonctionnalisée par l'alendronate.

	$\nu\text{C=O}$ (ester) (cm^{-1})	Bandes d'absorption des Cycles aromatiques (cm^{-1})
R123	1710	1650 1475 1595 1411 1540
$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA-R123}$	1760	1698 1503 1612 1422 1567

Tableau 6: Déplacement des bandes caractéristiques de la Rhodamine 123 après couplage sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$

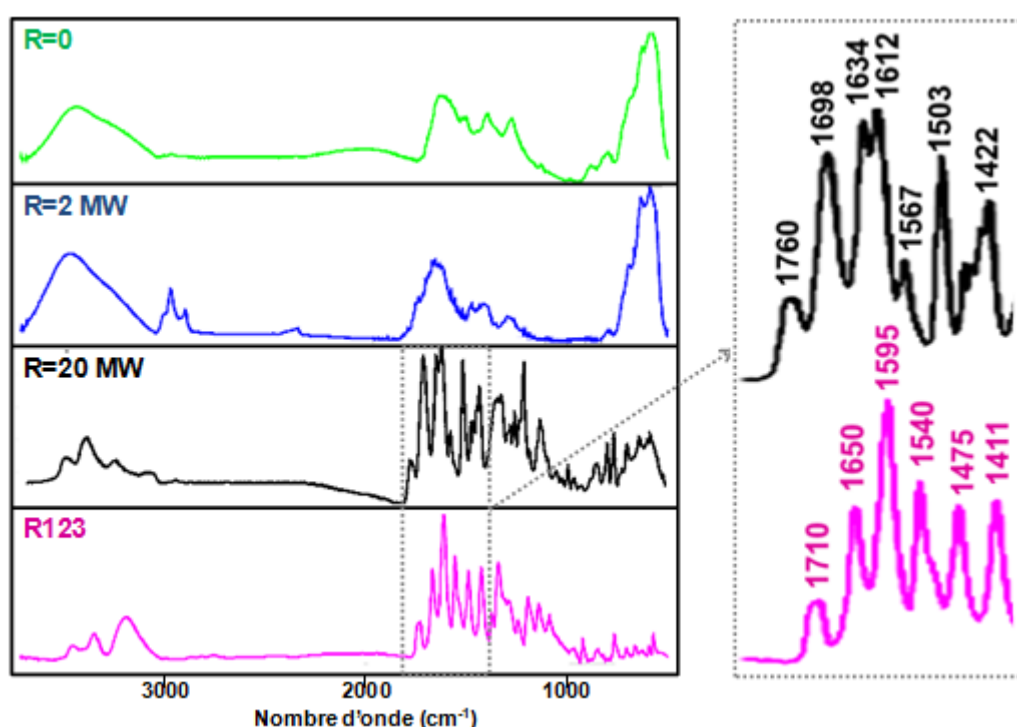


Figure 16 : Spectres infrarouges des nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ en fonction du nombre de molécules R123 couplées (R=0 en vert, R=2 MW en bleu et R=20 MW en noir) et du fluorophore (en rose)

Les spectres d'absorption et les signatures MIAplex de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ avant et après couplage de la Rhodamine 123 pour les ratios R=2 et R=20 sous microondes sont présentés Figure 17. Les spectres d'absorption et les signatures MIAplex pour un ratio R=2 et R=20 à température ambiante étant similaires à celui du ratio R=2 MW n'ont pas été représentés sur la figure. Tout comme précédemment, des changements notables apparaissent à partir d'un ratio R=20 MW. Par spectroscopie d'absorption, un léger épaulement aux alentours de 520 nm apparaît, montrant la présence du fluorophore. Par MIAplex, la signature caractéristique des nanoparticules superparamagnétiques est conservée, cependant une

diminution de l'amplitude du signal est observée. Des résultats similaires avaient été obtenus par Benyettou *et al.*²⁶ L'hypothèse d'une augmentation des interactions attractives entre nanocristaux induite par la présence de molécules de Rhodamine avait alors été formulée, et pouvait être corrélée à l'augmentation de la taille hydrodynamique des nanocristaux.

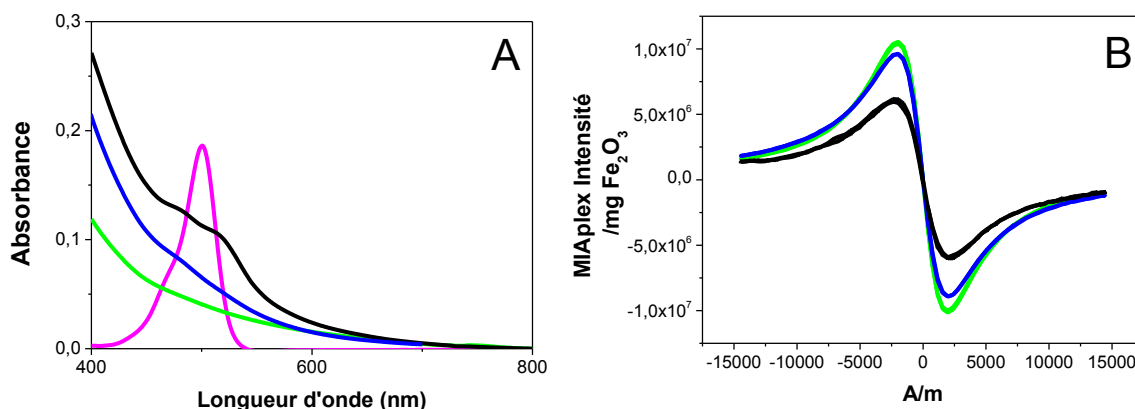


Figure 17 : (A) Spectres d'absorption de la rhodamine R123 (courbe rose $C=3.10^{-6} \text{ M}$), $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ (courbe verte $C_{\text{Fe}}=0,7.10^{-4}\text{M}$), $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA\text{-R123 R=2MW}$ (courbe bleue, $C_{\text{Fe}}=1,3.10^{-4}\text{M}$) et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA\text{-R123 R=20 MW}$ (courbe noire $C_{\text{Fe}}=1,7.10^{-4}\text{M}$) ; (B) Signatures MIAplex (normalisées / mg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) des nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ (courbe verte), $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA\text{-R123 R=2MW}$ (courbe bleue) et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA\text{-R123 R=20 MW}$ (courbe noire)

Ces différentes méthodes de caractérisation nous ont permis d'avoir un point de vue qualitatif sur le nombre de fluorophores couplés sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$. Afin d'évaluer ce nombre, la spectroscopie de fluorescence a été utilisée. Il est connu que les propriétés de fluorescence de ces molécules sont changées au voisinage des surfaces de métaux, et il est généralement observé une extinction de fluorescence.²⁷ En effet, à proximité d'une telle surface, l'excitation peut être dissipée à la suite d'un transfert d'énergie des atomes de fer. De plus, ces fluorophores peuvent éteindre mutuellement leur fluorescence s'ils sont suffisamment proches dans l'espace. Ainsi la fluorescence mesurée sur les nanocristaux hybrides ne pourra pas permettre de quantifier directement le nombre de molécules couplées à la surface. En effet, nous aurions un nombre de fluorophores sous-estimé. Il sera donc nécessaire de décrocher les molécules greffées et de les quantifier libres en solution. Afin de quantifier le nombre de fluorophores et le taux d'extinction sur les nanoplateformes, l'intensité de fluorescence est mesurée sur les nanoplateformes fluorescentes et comparée à celle des molécules de Rhodamine désorbées de la surface (cf Annexe 3.1). La Figure 18 montre les spectres de fluorescence de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA\text{-R123}$ (R=2 MW) avant et après désorption des fluorophores, ce qui met en évidence le taux d'extinction. Par comparaison avec le spectre du fluorophore libre en solution, un léger déplacement du maximum vers le bleu est observé sur les particules couplées à la Rhodamine.

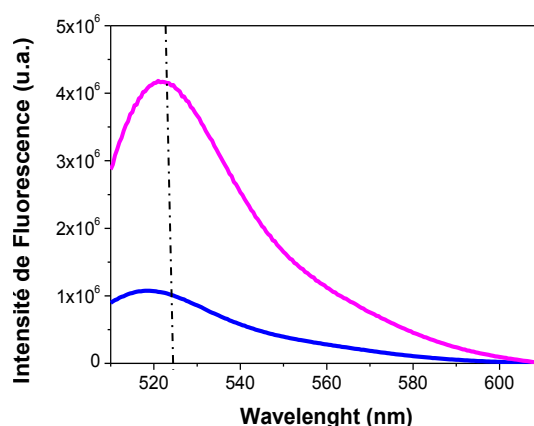


Figure 18 : Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA-R123}$ $C_{\text{Fe}} = 2.10^{-4} \text{ M}$, $R=2$ MW avant (bleu) et après désorption des fluorophores (rose) ($R = n_{\text{R123}}/n_{\text{COOH}}$)

Le nombre de fluorophores, le taux d'extinction ainsi que les images de fluorescence sont présentés dans le Tableau 7 pour les différents ratios. De manière générale, les résultats montrent que le nombre de molécules greffées à la surface augmente soit avec le ratio R soit avec l'utilisation des micro-ondes. Le taux de greffage de la Rhodamine R123, sous énergie « normale », reste néanmoins assez faible. Ainsi, pour un ratio $R=20$, il est seulement de 1%. L'utilisation des micro-ondes permet d'augmenter la quantité de molécules greffées pour un même ratio, ainsi, on obtient un taux de greffage de l'ordre de 5%, pour $R=20$ MW. Les faibles taux de greffage obtenus par chimie des carbodiimides peuvent être dus, d'une part à une faible activation des acides carboxyliques à la surface des nanoparticules et d'autre part, à l'encombrement stérique, dus aux cycles aromatiques de la Rhodamine 123 proches de la fonction amine réactive.





R	Nbre R123 sur nano	Nbre R123 après décrochage	% R123	Taux d'extinction	Image fluorescence
2	0	3 ± 1	$0,3 \pm 0,1$	5	
20	2 ± 1	12 ± 1	$1 \pm 0,1$	4	
2 MW	3 ± 1	11 ± 3	$1 \pm 0,3$	6	
20 MW	11 ± 1	55 ± 1	$5 \pm 0,1$	5	

Tableau 7 : Quantification du nombre de Rhodamines par nanoparticules avant et après désorption des fluorophores, taux d'extinction et images de fluorescence en fonction du rapport R

II. 3. Nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA-PEG}$

La seconde molécule couplée aux nanoplateformes est une chaîne PEG. Le but est d'apporter une meilleure furtivité et stabilité. Comme il a été vu dans le chapitre 1, le PEG est une molécule biocompatible qui a été utilisée dans les vecteurs de seconde génération. La

présence du PEG permet de détourner les nanoparticules de leur cible de prédilection, les macrophages hépatiques et d'augmenter ainsi le temps de circulation *in vivo*. Par ailleurs, ce polymère peut également avoir un rôle sur la stabilisation des nanoparticules en évitant leur agrégation.

Le PEG hétérobifonctionnel utilisé est représenté Figure 19. Il possède une fonction amine nécessaire au couplage par chimie des carbodiimides et une fonction acide carboxylique, qui se retrouvera donc à la surface externe de la nanoplateforme et pourra servir au couplage d'autres molécules. Dans ce cas, le PEG servira d'espaceur entre la molécule couplée et la nanoplateforme. La fonctionnalisation et l'efficacité du greffage du PEG ont été évaluées par analyse thermogravimétrique, par spectroscopie infrarouge, ou par dosage des fonctions amines (dosage OPA). Le couplage a été réalisé selon le protocole défini précédemment et en utilisant les micro-ondes afin de maximiser le nombre de molécules couplées.

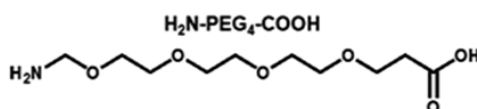


Figure 19 : Structure chimique du PEG utilisé pour le couplage sur $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$

II. 3. 1. Caractérisation de l'état de surface et quantification du nombre de molécules PEG

La signature du $\text{H}_2\text{N-PEG}_4\text{-COOH}$, Figure 20 (spectre noir) est caractérisée par une bande à 1106 cm^{-1} correspondant à la vibration de valence $\nu\text{C-O}$ des éthers aliphatiques et des bandes à 1410 et 1575 cm^{-1} caractéristiques des vibrations de valence $\nu\text{C=O}$ des acides carboxyliques. La Figure 20 montre que la bande $\nu\text{C-O}$ du PEG n'interfère pas avec les bandes caractéristiques de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$, il sera ainsi possible de quantifier le nombre de PEG couplés à la surface de la nanoplateforme. Pour cela, une droite de calibration a été établie en mélangeant une quantité constante de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ avec une quantité croissante de PEG, Figure 21A. Une augmentation linéaire de l'aire de la bande $\nu\text{C-O}$ à 1100 cm^{-1} (normalisé par rapport à l'aire de la bande de vibration de la liaison fer-oxygène à 600 cm^{-1}) en fonction du nombre de PEG est constatée, Figure 21B. Cette droite de calibration nous permet ainsi de déterminer le nombre de PEG couplés à la nanoplateforme pour les différents ratios R. Les spectres infrarouges des nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA-PEG}$ sont présentés Figure 22 et les résultats obtenus Tableau 8.

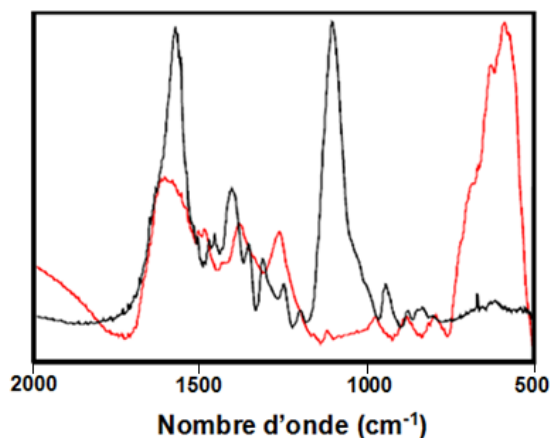


Figure 20 : Comparaison des spectres infrarouges du $\text{H}_2\text{N-PEG-COOH}$ (spectre noir) et de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ (spectre rouge)

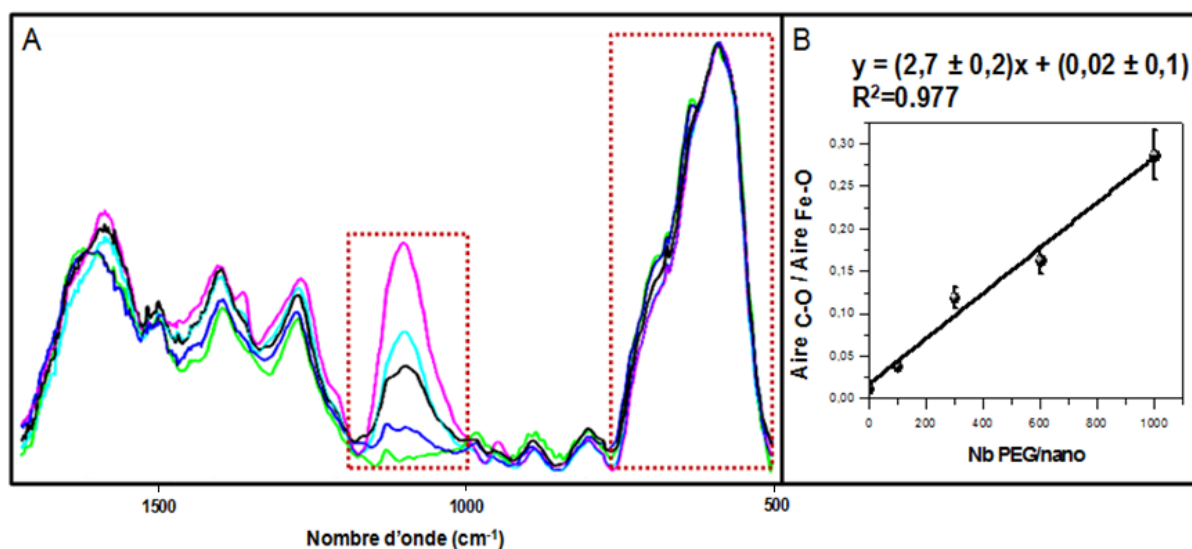


Figure 21 : Spectres infrarouge de mélanges de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ (en vert) avec une quantité croissante de PEG : 100 (en bleu foncé), 300 (en noir), 600 (en bleu clair) et 1000 (en violet) PEG par nanoparticule et courbe de calibration

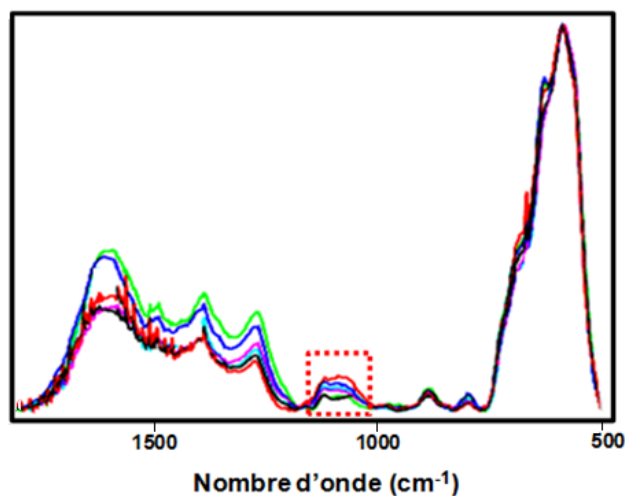


Figure 22 : Spectres infrarouges après couplage du PEG sur $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ pour différents rapports R : R=2 (en noir), R=5 (en vert), R=20 (en bleu) et R=50 (en rouge)

R	Nb PEG/nano (IR)	% PEG/nano (IR)	Nb PEG/nano (OPA)	% PEG/nano (OPA)
2	68 ± 7	6 ± 1	88 ± 13	8 ± 1
5	70 ± 8	6 ± 1	80 ± 20	7 ± 2
20	140 ± 15	13 ± 1	120 ± 6	11 ± 1
50	170 ± 18	15 ± 2	142 ± 7	13 ± 1

Tableau 8 : Détermination du nombre de PEG couplés sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ en fonction du rapport R par spectroscopie infrarouge et dosage OPA

Afin de vérifier la fiabilité de cette méthode de quantification par infrarouge, nous avons comparé le résultat obtenu par ATG pour un ratio R=5. La Figure 23 montre les courbes ATG de la nanoplateforme (A) avant et (B) après couplage du PEG. La différence de perte de masse entre les deux nanoplateformes (1,7%) correspond à la quantité de PEG, calculé à partir de l'équation 1, soit 100 ± 30 ($9 \pm 3\%$) PEG par nanoparticule. Ainsi les résultats obtenus par infrarouge (70 ± 8 PEG) et par ATG (100 ± 30 PEG) sont du même ordre de grandeur et valide la quantification par la méthode infrarouge. L'avantage de cette dernière méthode est d'utiliser une faible quantité de produit (< 1 mg) en comparaison de l'ATG (> 10 mg).

$$\frac{PEG}{nano} = \frac{n_{PEG}}{n_{CA}} \cdot Nb(CA/nano) = \frac{\Delta m_{PEG}(\%) \cdot M_{CA}}{\Delta m_{CA}(\%) \cdot M_{PEG}} \cdot Nb(CA/nano) \quad (1)$$

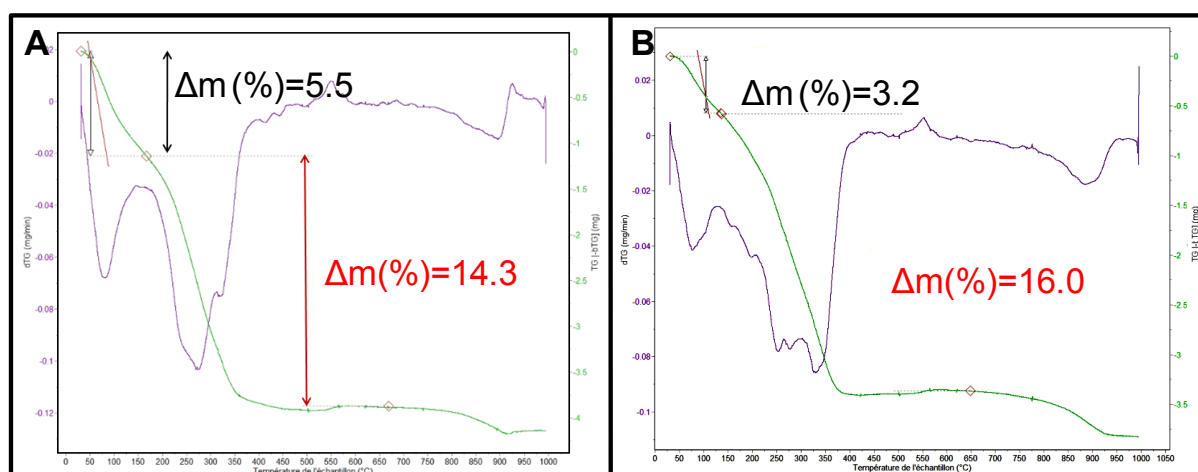


Figure 23 : Courbes ATG (vertes) et dérivées (violetttes) des nanoparticules (A) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ et (B) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA\text{-PEG R=5 MW}$

La quantification a également été réalisée en dosant les fonctions amines à l'aide du réactif Fluoraldéhyde. Il s'agit d'une solution d'o-phthalaldéhyde (OPA) qui réagit avec les fonctions

amines primaires en présence du 2-mercaptoéthanol pour former un composé fluorescent bleu, Figure 24. L'excitation se fait à 330 nm et l'émission de fluorescence est localisée à 475 nm.

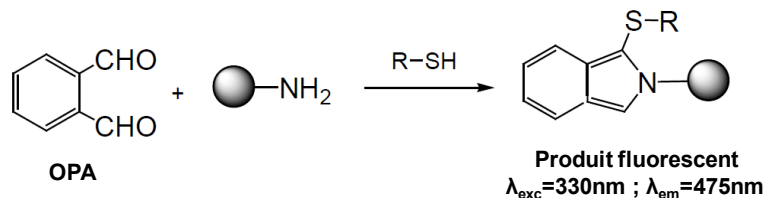


Figure 24 : Réaction de l'OPA avec les fonctions amines primaires et formation d'un composé fluorescent

Pour réaliser ce dosage sur les nanoplateformes, il est nécessaire d'hydrolyser les liaisons amides. Ceci peut être réalisé dans des conditions extrêmes de pH soit en milieu acide soit en milieu basique. Lors du dosage OPA, la réponse de fluorescence des acides aminés augmente avec le pH de la solution, ainsi l'hydrolyse en milieu basique a été préférée. Le protocole de dosage est décrit dans l'Annexe 3. Aux incertitudes près, les taux de greffage obtenus par la méthode OPA sont similaires à ceux obtenus par la méthode de spectroscopie infrarouge, Tableau 8.

Ainsi, les différentes méthodes de quantifications montrent qu'en augmentant le ratio R, le nombre de PEG par nanoparticule est plus important. Nous passons d'une nanoplateforme PEGylée de 6 à 8% pour R=2 à 13 à 15 % pour R=50, Tableau 8. En comparaison avec le couplage de la Rhodamine 123, Tableau 7, on remarque que le taux de greffage est supérieur pour le PEG. En effet, pour un ratio R=2 sous micro-ondes, on obtenait environ 1% de R123 par nanoparticule et pour un ratio supérieur sous micro-ondes, R=20, environ 5%. Les taux de greffage plus importants lors du couplage du PEG peuvent s'expliquer par le plus faible encombrement stérique de celui-ci. Par ailleurs, cette étude a permis de mettre en avant différentes méthodes de quantification (infrarouge et OPA) nécessitant une plus faible quantité de produits en comparaison avec l'analyse thermogravimétrique.

II. 3. 2. Propriétés hydrodynamiques et magnétiques

L'évolution de la taille hydrodynamique et du potentiel de surface en fonction du rapport R a été étudiée, Tableau 9. La taille hydrodynamique et le potentiel de surface des nanoplateformes PEGylées sont similaires à la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$. La faible variance observée sur la taille peut s'expliquer en tenant compte de l'hydrophilie et de la

faible longueur du PEG (18,1 Å). L'invariance du potentiel de surface s'interprète en considérant que la fonction acide carboxylique de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ est remplacée par une autre fonction acide carboxylique provenant du PEG. Concernant les propriétés magnétiques, on retrouve la signature caractéristique des nanoparticules superparamagnétiques quel que soit le nombre de PEG greffé, Figure 25. L'intensité du signal reste constante, montrant que la présence du PEG ne déstabilise pas la nanoplateforme,

R	D_h (nm)	Pdl	Zeta (mV)
0	14.2	0.2	-45±5
2	11.8	0.3	-41±7
5	10.2	0.3	-41±7
20	17.7	0.3	-34±9
50	11.6	0.3	-47±7

Tableau 9 : Evolution des propriétés hydrodynamiques sur les nanoplateformes PEGylées

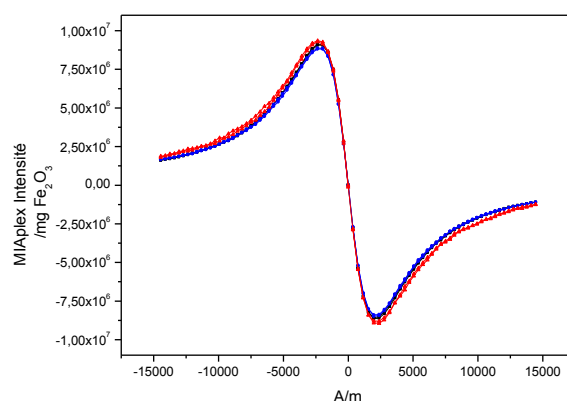


Figure 25 : Evolution de la signature MIAplex® (normalisée / mg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en fonction du nombre de PEG couplés (R=0 en noir, R=2 en rouge et R=20 en bleu)

Ainsi, la structure hydrophile et peu encombrée du PEG permet de conserver la taille hydrodynamique de la nanoplateforme et de maintenir l'intensité du signal MIAplex quel que soit le ratio, contrairement à ce que l'on avait observé lors du couplage du fluorophore.

II. 4. Nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA\text{-RGD}$ et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA\text{-(PEG-RGD)}$

La troisième molécule couplée à cette nanoplateforme est une molécule présentant le motif RGD, capable de cibler les intégrines $\alpha_v\beta_3$. Il s'agit de molécules basées sur la séquence peptidique cRGDfK, Figure 26A, présentant une fonction réactive de type amine sur le résidu de la lysine, servant au couplage par chimie des carbodiimides. Par ailleurs, une chaîne PEG a été ajoutée entre le motif RGD et la fonction amine terminale afin de servir d'espaceur entre le motif RGD et la nanoplateforme, Figure 26B.

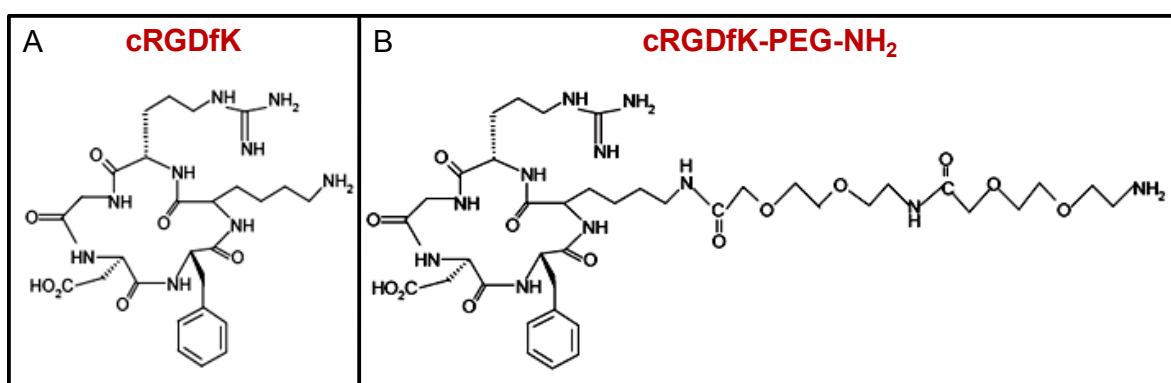


Figure 26 : Molécules présentant le motif RGD utilisées lors des couplages sur $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$

Lors du couplage par carbodiimide, la question de la réactivité de la fonction amine de l'arginine sur la chaîne latérale peut se poser, pouvant avoir des conséquences sur l'affinité des intégrines. Cependant, du à la protonation dans l'eau, la nucléophilie de la fonction amine sur la chaîne latérale de l'arginine est presque nulle. Ainsi le couplage peut être réalisé sans introduction de groupement protecteur.²⁸

Comme précédemment, les couplages sont réalisés sous micro-ondes pour différents ratios R. Cependant les conditions ont été modifiées par rapport à la température (65°C) afin de ne pas altérer la structure chimique des peptides (cf tableau 3). Ceci est vérifié sur les spectres infrarouges du cRGDfK avant et après micro-onde, qui restent inchangés, Figure 27. La fonctionnalisation et l'efficacité du greffage du cRGDfK ont été évaluées par la méthode de dosage des amines à l'aide du réactif OPA. En effet, cette méthode a l'avantage de nécessiter peu de quantité de produits, compte tenu du coût commercial des peptides.

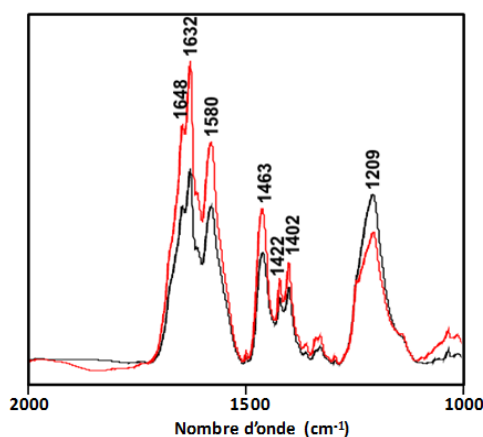


Figure 27 : Spectres infrarouges du cRGDfK avant (noir) et après (rouge) micro-onde

Les différentes nanoplateformes ainsi élaborées ont également été caractérisées par diffusion de la lumière et l'évolution des propriétés magnétiques a été étudiée par MIAplex, Figure 28. L'ensemble des résultats (nombre de cRGD, % de cRGD, taille hydrodynamique et potentiel de surface) est regroupé dans le Tableau 10.

	R (MW)	Nb RGD /nano	% RGD /nano	D_h (nm)	Pdl	Zeta (mV)
cRGDfK	0.2	25 ± 2	2 ± 0.2	16	0.3	-44 ± 12
	2	43 ± 4	3 ± 0.4	18	0.2	-43 ± 12
	20	59 ± 9	5 ± 1	15	0.3	-44 ± 8
cRGDfK- PEG-NH ₂	0.2	35 ± 8	3 ± 1	22	0.3	-36 ± 12
	2	61 ± 3	5 ± 0.3	18	0.2	-39 ± 7
	20	130 ± 30	10 ± 3	30	0.3	-40 ± 10

Tableau 10 : Résultats de couplages d'un motif RGD sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$

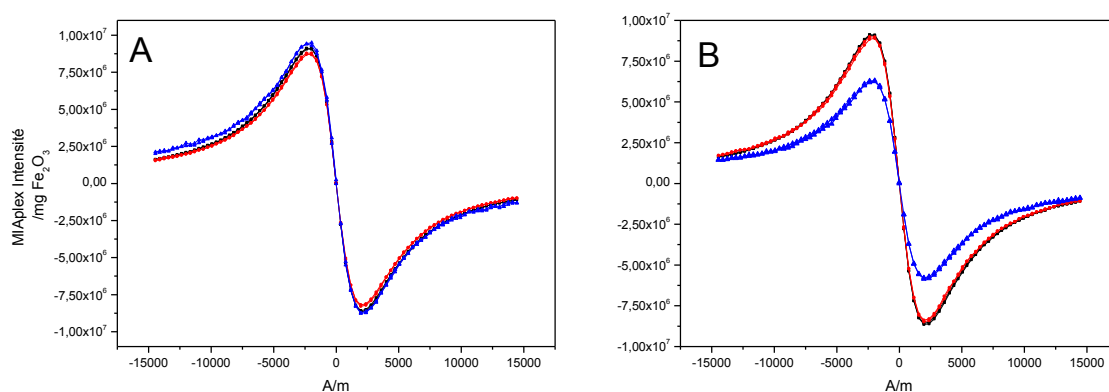


Figure 28 : Evolution de la signature MIAplex® (normalisée / mg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en fonction du nombre de (A) cRGDfK couplés et (B) cRGDfK-PEG-NH₂ couplés (R=0 en noir, R=2 en rouge et R=20 en bleu)

Lors du couplage du cRGDfK, la taille hydrodynamique, le potentiel de surface et l'intensité du signal magnétique restent similaires à celles de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$, quel que soit le rapport R. En ce qui concerne le couplage du cRGDfK-PEG-NH₂, l'augmentation du ratio entraîne une augmentation de la taille hydrodynamique indiquant d'un point de vue qualitatif un nombre plus important de peptides couplés. Cette augmentation de l'état d'agrégation se traduit par une diminution de l'intensité du signal MIAplex pour un rapport R=20. D'un point de vue quantitatif, les dosages OPA montrent que, comme lors du couplage du fluorophore et du PEG, l'augmentation du rapport R permet d'augmenter le nombre de peptides couplés, cRGDfK ou cRGDfK-PEG-NH₂, sur la surface des nanoparticules. De plus, pour un même ratio, par exemple R=20, le taux de greffage du cRGDfK et du cRGDfK-PEG-NH₂ est respectivement de 5 et 10 %. Ainsi, nous pouvons observer que l'éloignement du peptide de la fonction réactive par l'introduction d'une chaîne PEG, a pour effet d'augmenter le nombre de molécules couplées. Ceci démontre l'importance de l'encombrement stérique à proximité de la fonction réactive sur le taux de couplage.

II. 5. Elaboration des nanoplateformes multimodales superparamagnétiques

Précédemment, nous avons étudié séparément le couplage d'un fluorophore, d'une chaîne PEG ou d'un motif RGD sur les nanoplateformes. L'intérêt est maintenant de pouvoir les regrouper sur une même nanoplateforme, permettant ainsi d'accéder à la double imagerie (présence du fluorophore) tout en ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (présence du motif RGD). L'ordre de la plurifonctionnalisation va ainsi être discuté. Le motif RGD sera, dans tous les cas, couplé lors de la dernière étape de fonctionnalisation notamment afin d'éviter, lors d'un couplage carbodiimide, une activation de l'acide carboxylique de l'acide aspartique et donc une possibilité de couplage sur celui-ci qui pourrait affecter l'affinité du peptide vis-à-vis des intégrines.

Tout d'abord nous nous sommes intéressés à définir le ratio à utiliser pour chacune des molécules. Nous avons donc choisi un ratio R=2 pour le fluorophore permettant d'avoir une fluorescence suffisante et visible en imagerie ainsi que des propriétés hydrodynamiques proches de la nanoplateforme de départ ; un ratio R=50 pour le H₂N-PEG-COOH pour obtenir

le maximum de chaînes PEG et un ratio $R=2$ pour les peptides cRGD permettant d'utiliser une quantité raisonnable de produits compte tenu des prix élevés.

L'ordre de la plurifonctionnalisation entre le fluorophore et les chaînes PEG a été défini en étudiant son effet sur le nombre de molécules greffées, le taux d'extinction de fluorescence et les propriétés hydrodynamiques. L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le Tableau 11. Les quantités de fluorophores et de PEG sont relativement proches et un taux d'extinction similaire est observé dans les deux cas. Les caractéristiques hydrodynamiques (taille hydrodynamique et potentiel de surface) sont également du même ordre de grandeur. Ainsi, dans ce cas présent, peu de différences sont observées selon l'ordre de fonctionnalisation. Cependant, une augmentation du taux d'extinction est observée après une seconde étape de fonctionnalisation (de 4 à 7) qui peut être corrélée à l'augmentation de la taille hydrodynamique caractéristique d'un plus fort état d'agrégation et donc d'un plus important taux d'extinction intermoléculaire.

Deux types de nanoplateformes multimodales sont envisagés. La première méthode consiste à réaliser une fonctionnalisation en trois étapes : tout d'abord le couplage du fluorophore R123, puis le couplage des chaînes $\text{H}_2\text{N-PEG-COOH}$ et une dernière étape pour le couplage du cRGDfK. La seconde méthode, quant à elle, ne nécessite que deux étapes : le couplage du fluorophore puis du cRGDfK-PEG- NH_2 puisque la chaîne PEG est déjà présente sur cette dernière molécule.





Ordre de fonctionnalisation										
1	2	3	R123	% R123	Image de Fluorescence	PEG	% PEG	cRGD	% cRGD	
PEG	R123	-	8 ± 1	0.7 ± 0.1		142 ± 7	13 ± 0.6	-	-	
R123	PEG	-	11 ± 2	1 ± 0.2		93 ± 11	8 ± 1	-	-	
R123	cRGDfK-PEG-NH ₂	-	11 ± 2	1 ± 0.2		64 ± 1	3 ± 0.2	64 ± 1	6 ± 0.1	
R123	PEG	cRGDfK	11 ± 2	1 ± 0.2		93 ± 11	8 ± 1	62 ± 5	6 ± 0.5	
Ordre de fonctionnalisation										
1	2	3	Taux d'extinction Avant - Après		D _h (nm) Avant - Après		Pdl Avant - Après		Zeta (mV) Avant - Après	
PEG	R123	-	-	7	12	31	0.3	0.3	-47±7	-37±6
R123	PEG	-	4	7	24	34	0.3	0.3	-44±7	-41±11
R123	cRGDfK-PEG-NH ₂	-	4	32	24	35	0.3	0.2	-44±7	-44±6
R123	PEG	cRGDfK	7	29	34	37	0.3	0.3	-41±11	-33±7

Tableau 11: Nombre et pourcentage de R123, PEG et cRGD par nanoparticule, images de fluorescence, taux d'extinction et propriétés hydrodynamiques des nanoplateformes multimodales

L'efficacité de couplage du cRGDfK-PEG-NH₂ est similaire à celui observé sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ (cf Tableau 10). En effet, une soixantaine de molécules cRGDfK-PEG-NH₂ sont greffés dans les deux cas. Ainsi, la présence du fluorophore n'a pas affecté le couplage du cRGDfK-PEG-NH₂. Par ailleurs, une quantité comparable de peptide cRGDfK a été évaluée avec la fonctionnalisation en trois étapes (62 cRGDfK). Les deux méthodes permettent de synthétiser des nanoplateformes similaires au point de vue des propriétés hydrodynamiques, du nombre de cRGD, PEG ou R123 couplés et du taux d'extinction, Tableau 11. D'un point de vue pratique, la fonctionnalisation en deux étapes est à privilégier. Notons que le taux d'extinction a largement augmenté, mais qu'il reste néanmoins suffisant pour l'imagerie de fluorescence.

Au niveau des propriétés magnétiques, la Figure 29 présente les signatures MIAplex des différentes nanoplateformes multimodales. Dans les deux cas, l'intensité du signal a diminué par rapport à la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$. Cette observation peut être reliée, comme précédemment, à un état d'agrégation plus important.

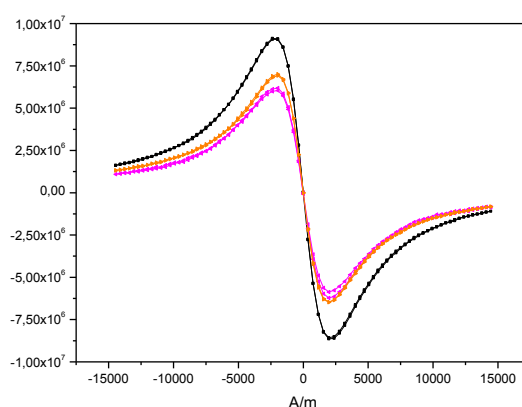


Figure 29 : Evolution de la signature MIAplex® (normalisées / mg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) des nanoplateformes multimodales obtenues en 2 étapes (rose) et 3 étapes (orange) en comparaison avec la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ (noir)

La synthèse de nanoplateformes fonctionnalisées par un fluorophore, des chaînes PEG et un motif cRGD a été réalisée et caractérisée avec succès. Pour compléter cette étude, les prochaines étapes consistent à évaluer leur potentiel en tant qu'agent de contraste IRM, étudier leur stabilité dans un milieu biologique, ainsi que mesurer leur affinité vis-à-vis des intégrines $\alpha_v\beta_3$.

III. Evaluation des nanoplateformes synthétisées en tant qu'agent de contraste IRM

L'influence du couplage d'un fluorophore, d'un PEG ou d'un motif RGD sur leur potentiel en tant qu'agent de contraste IRM a été étudié en utilisant les séquences précédemment établies (cf Annexe 2.6). La Tableau 12 répertorie les valeurs de relaxivités r_1 et r_2 obtenues pour les différentes nanoplateformes. Nous pouvons ainsi constater que le couplage de petites molécules sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ a peu d'influence sur la relaxivité puisque les valeurs r_1 (7.4 à 11.1 $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$) et r_2 (170 à 186 $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$) varient peu selon la fonctionnalisation, et restent du même ordre de grandeur que celles sur la nanoplateforme de référence ($r_1=7.4 \pm 0.6 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et $r_2 = 186 \pm 5 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$).

Nanoplateformes	$r_1 (\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1})$	$r_2 (\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1})$
$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$	7.4 0.6	186 5
$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}-(\text{PEG-RGD}) \text{ R}=2$	7.5 0.6	174 7
Multimodale (2 étapes)	10.3 ± 0.5	186 ± 4
Multimodale (3 étapes)	11.1 0.2	170 14

Tableau 12 : Relaxivités r_1 et r_2 des différentes nanoplateformes synthétisées

IV. Evaluation de la stabilité en milieu biologique

La stabilité des nanoparticules dans le sérum est un critère important pour leur utilisation en tant que système de ciblage *in vivo*. La stabilité de ces nanoplateformes en milieu biologique a ainsi été étudiée par spectroscopie de fluorescence. En effet la fluorescence sera différente si le fluorophore est accroché à la nanoplateforme (taux d'extinction) ou si celui-ci est libre en solution. Pour cela, la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA-R123}$ (11 fluorophores) a été dispersée dans du sérum de veau fœtal (SVF) à 10% ou 50 %, à une concentration de 0.1 mM en fer. L'évolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps a été enregistrée.

Afin d'évaluer le relargage du fluorophore, nous avons tout d'abord évalué le taux d'extinction dans chaque milieu. Des valeurs relativement similaires de 4.8, 4.9 et 4.0, respectivement dans l'eau, 10% de sérum et 50% sérum, ont été calculées. Ces taux d'extinctions sont utilisés pour le calcul du taux de relargage, défini à partir de l'équation 2 :

$$\text{relargage (\%)} = \frac{I_t - I_0}{Q \cdot I_0} \cdot 100 \quad (2)$$

avec I_t l'intensité de fluorescence à un instant t
 I_0 l'intensité de fluorescence à un instant $t=0$
 Q le taux d'extinction

Les résultats sont reportés Figure 30. Après 24h, le relargage est inférieur à 15%, ce qui montre la bio-stabilité des nanoplateformes et laisse envisager la possibilité de leur utilisation *in vivo*. Par ailleurs, afin de déterminer si celui-ci est dû à la coupure de la liaison amide entre l'acide caféique et la rhodamine ou à un relargage de la molécule CA-R123, l'expérience a été réalisée en présence d'anti-protéases dans le sérum. Les protéases sont connues pour hydrolyser les liaisons peptidiques, ainsi leur élimination du sérum permettra d'éliminer l'hypothèse d'un relargage par une coupure de la liaison amide. Un relargage similaire est obtenu avec ou sans anti-protéases, ce qui indique que le relargage se produit par un décrochement du complexe de la nanoplateforme.

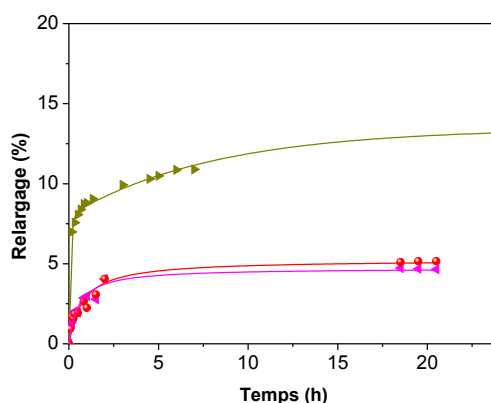


Figure 30 : Etude du relargage sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA-R123$ (11 fluorophores) dans 10 % SVF (rose), 50 % SVF (vert) et 10% SVF + anti-protéases (rouge)

V. Affinité des nanoplateformes vis-à-vis des intégrines

Afin d'étudier l'affinité des nanoplateformes vis-à-vis des intégrines $\alpha_v\beta_3$, différentes stratégies ont été envisagées. La première consiste à utiliser un procédé basé sur la résonance plasmonique de surface (SPR, cf Annexe 3.3), et la seconde à réaliser un dosage de liaisons sur support solide en présence d'un compétiteur (Solid Phase Binding Assay, cf Annexe 3.4).

V. 1. Etude par SPR (BIAcore)

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé un appareil BIAcore X100 (GE healthcare) et une puce CM5, surface d'or recouverte de carboxyméthyl-dextran (CMD). Cette puce est constituée de deux pistes : une piste de référence et une piste de mesure. Nous avons tout d'abord essayé une stratégie standard qui consiste à coupler sur la piste de mesure de manière covalente, via la fonction amine, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (cf Annexe 3.3). Lors de ce type d'immobilisation, la reconnaissance du motif RGD ne pourra se faire que si les deux sous unités alpha et beta de l'intégrine sont proches. L'activité des intégrines sur la surface a ainsi été vérifiée en utilisant une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, la vitronectine. Nous avons ensuite voulu tester l'affinité du peptide cyclique cRGDfK, mais son faible poids moléculaire n'a pas permis l'obtention de résultats concluants. Nous avons donc changé la procédure standard, et avons immobilisé les nanoplateformes directement sur la puce (sans activation préalable) en utilisant la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ comme référence, Figure 31. Malgré des procédures de lavage extrêmes (NaOH ou HCl 100mM), un signal RU constant est observé, démontrant une forte interaction entre les nanoplateformes et le CMD.

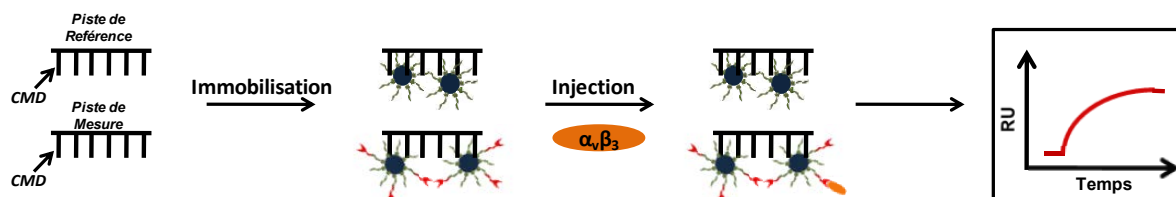


Figure 31 : Procédure utilisée lors de l'étude par SPR : Les nanoparticules sans cRGD ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$) et avec cRGD ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -cRGD ou $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -(PEG-cRGD)) sont immobilisées respectivement sur la piste de référence et sur la piste de mesure puis l'intégrine est injectée à une concentration définie. Le signal obtenu en RU témoigne de l'affinité de la nanoplateforme vis-à-vis des intégrines.

Les nanoplateformes étudiées sont $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$, $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -cRGD (43 cRGDfK par nanoparticule) et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -(PEG-cRGD) (61 cRGDfK-PEG-NH₂ par nanoparticule). La Figure 32A montre les sensorgrammes obtenus après immobilisation des différentes nanoplateformes. Avant injection des intégrines $\alpha_v\beta_3$, les valeurs de RU obtenus pour les nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ (coube noire), et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -cRGD (courbe verte) sont élevées : 1500 et 1800 respectivement. La réponse est beaucoup plus faible pour la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -(PEG-cRGD) et atteint seulement 230 RU après 3 injections (courbe rouge). Ceci indique que les interactions de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -(PEG-cRGD) avec le CMD sont largement diminuées, ce qui peut être lié à la présence du lien PEG qui doit limiter la possibilité de liaisons hydrogènes.

Après injection des intégrines $\alpha_v\beta_3$, Figure 32B :

- un signal constant (courbe noire) est observé avec la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ indiquant aucune interaction avec les intégrines.
- Le signal augmente en ce qui concerne les autres nanoplateformes et atteint 100 RU pour $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -cRGD (courbe verte) et 14 RU pour $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -(PEG-cRGD) (courbe rouge), indiquant des interactions RGD-intégrines.

La capacité de liaison peut être évaluée de façon théorique à l'aide de la relation 3. En tenant compte du signal spécifique (RU) de chaque plateforme immobilisée et en supposant une masse moléculaire de 150 kDa pour l'intégrine et 1300 kg/mol pour les nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -cRGD et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -(PEG-cRGD). Les valeurs calculées sont respectivement 200 RU et 25 RU. Ces résultats sont en accord avec ceux observés expérimentalement.

$$\text{Capacité théorique de liaison (RU)} = \frac{\text{Analyte (MW)}}{\text{Ligand (MW)}} \cdot \text{Ligand immobilisé (RU)} \quad (3)$$

Par ailleurs, il est à noter que pour la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -(PEG-cRGD), un signal RU est obtenu qu'à partir d'une concentration en intégrines de 30 nM. Ceci s'interprète en tenant compte du faible taux d'immobilisation de la nanoplateforme. Les mesures cinétiques n'ont ainsi pu être effectuées qu'avec la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -cRGD. L'évolution du signal RU en fonction de la concentration en intégrines est présentée Figure 32C. En utilisant le modèle « steady state affinity » (cf Annexe 3.3), une affinité de la nanoplateforme vis-à-vis des intégrines de 9 nM est déduite. Cette valeur est plus faible que celle publiée dans la littérature pour le peptide cRGDfK (1.3 μM),²⁹ suggérant une meilleure affinité pour la nanoplateforme. Ceci peut être lié au nombre de cRGDfK greffés à la surface de la nanoplateforme (43) induisant un effet multivalent. Cette étude SPR nous a permis de montrer une affinité des nanoplateformes avec le cycloRGD vis-à-vis des intégrines et de la quantifier dans le cas de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -cRGD (R=2). Cependant, nous avons pu constater que cette technique présentait des limites et ne permettait pas de mesurer l'affinité pour toutes les nanoplateformes.

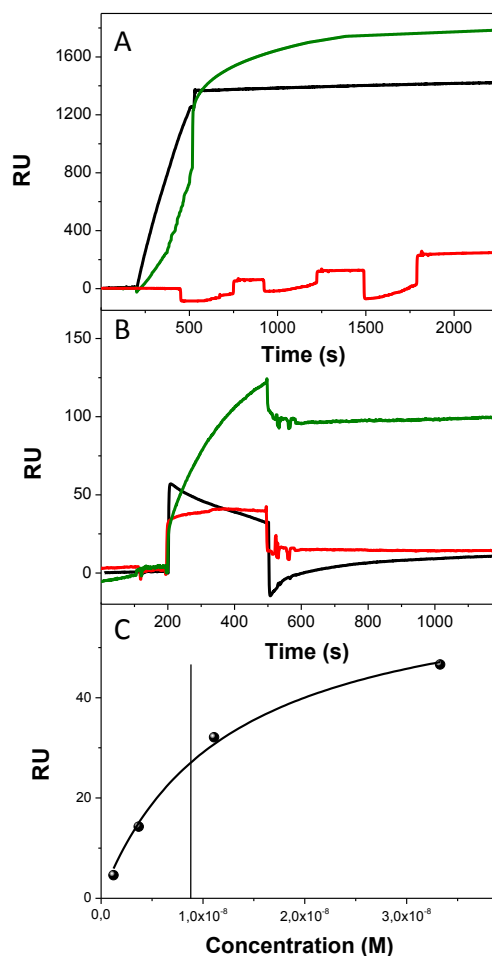


Figure 32 : (A) Immobilisation de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ (noir), $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -cRGD (vert) and $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -(PEG-cRGD) (rouge, après 3 injections) ; (B) Réponse après l'injection d' $\alpha_v\beta_3$ de 200 nM sur $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ (noir), 10 nM sur $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -cRGD (vert) et 30 nM sur $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -(PEG-cRGD) (rouge) ; (C) Cinétique réalisée sur $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -cRGD après injections de solutions d'intégrines à concentration croissante (1.23nM, 3.7nM, 11.1 nM et 33 nM)

V.2. Etude par dosage de liaison en présence d'un compétiteur

L'affinité des différentes nanoplateformes a été évaluée en utilisant une méthode basée sur le dosage de liaisons sur support solide en présence d'un compétiteur radioactif, l' ^{125}I -Echistatine. Cette étude a été réalisée dans le service de médecine nucléaire à l'Hôpital Avicenne (Dr V. Eder, Dr Y. Lalatonne). Le schéma du principe de dosage est présenté Figure 33 et le protocole expérimental est décrit en Annexe 3.4. Brièvement, cette méthode consiste à mettre en présence une quantité constante de ligand radioactif, l' ^{125}I -Echistatine, avec une quantité variable de ligand concurrent (nanoparticules ou peptides). Après lavages et solubilisation des entités liées, une mesure radioactive est effectuée. Une fois les courbes

tracées, nous pouvons déterminer l'IC50, qui correspond à la concentration du ligand concurrent supprimant 50% de la liaison spécifique du radioligand.

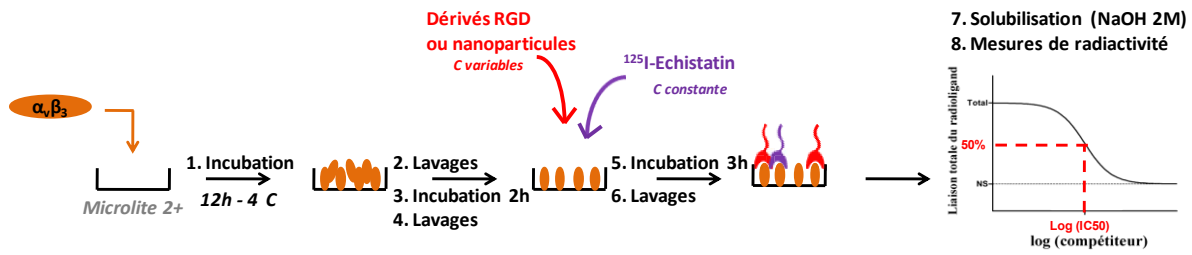


Figure 33: Schéma de principe du dosage de liaison en présence d'un compétiteur

Les constantes d'affinité K_i sont ensuite calculées selon l'équation 4, en tenant compte de la concentration d' ^{125}I -Echistatine dans le puits (0.05nM) et de sa constante d'affinité de 0.22nM (déterminée dans l'Annexe 3.4).³⁰

$$K_i = \frac{IC50}{1 + \frac{L^*}{K_d}} \quad (4)$$

Avec K_i la constante d'affinité

K_d la constante d'affinité de l'Echistatine (0.22 nM)

L^* la concentration d' ^{125}I -Echistatine dans le puits (0.05 nM)

La Figure 34 montre les courbes obtenues pour les différents ligands concurrents étudiés, et le Tableau 13 récapitule les valeurs d'IC50 et de K_i obtenues. Tout d'abord, il n'est pas observé d'interactions entre la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ et les intégrines, Figure 34A (courbe violette), ce qui confirme les résultats obtenus par la méthode BIAcore. En ce qui concerne les peptides seuls, les constantes d'affinité des ligands cRGDfK et cRGDfK-PEG-NH₂ sont respectivement 76 et 26 nM. L'amélioration de l'affinité entre ces deux molécules peut être reliée à une meilleure hydrophilie introduite par la présence du lien PEG. En ce qui concerne les nanoplateformes avec cRGD, les valeurs des constantes d'affinité des nanoparticules multivalentes sont améliorées en comparaison du ligand libre correspondant. Les nanoparticules avec un nombre équivalent de cRGDfK (59 ± 9) ou cRGDfK-PEG-NH₂ (61 ± 3) ont une affinité similaire, respectivement de 5 et 4 nM. Ainsi, l'introduction d'un groupement PEG entre la nanoplateforme et le motif RGD n'a pas induit une meilleure affinité contrairement aux ligands libres. Ceci peut être relié à la longueur de chaîne relativement faible (18,1 Å). Cependant, le meilleur taux de greffage obtenu avec le cRGDfK-

PEG-NH₂ (voir R=20, Tableau 13) conduit à une affinité subnanomolaire de 0.8 nM. Les nanoplateformes multimodales, Figure 34C, quant à elles, présentent une affinité équivalente (respectivement 3 et 7 nM pour la fonctionnalisation en deux ou trois étapes), qui est conforme à celle obtenue pour la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -(PEG-cRGD) présentant un nombre équivalent de peptides couplés (61 PEG-cRGD, $K_i = 4$ nM). Ainsi la présence du fluorophore n'a pas d'impact sur la valeur de l'IC₅₀.

Afin de relier K_i (multivalent) et K_i (libre), dans le cas où le nombre d'interactions ligand-cible n'est pas connu, Whitesides *et al.* ont défini un facteur de coopérativité β ($\beta = K_i$ (libre)/ K_i (multivalent)).³¹ Le Tableau 13 regroupe les valeurs de β obtenues pour les nanoparticules multivalentes testées. Ce facteur varie approximativement de 1 à 40 et augmente linéairement en fonction du nombre de cRGD sur la nanoplateforme, Figure 34D. Ceci est en accord avec les observations de Piletska *et al.*³² sur des nanoparticules biotinylées et Soukka *et al.*³³ sur des nanoparticules avec anticorps qui ont montré que l'avidité de la nanoplateforme vis à vis de sa cible est directement corrélée au nombre de sites de liaisons sur la surface de la nanoparticule.

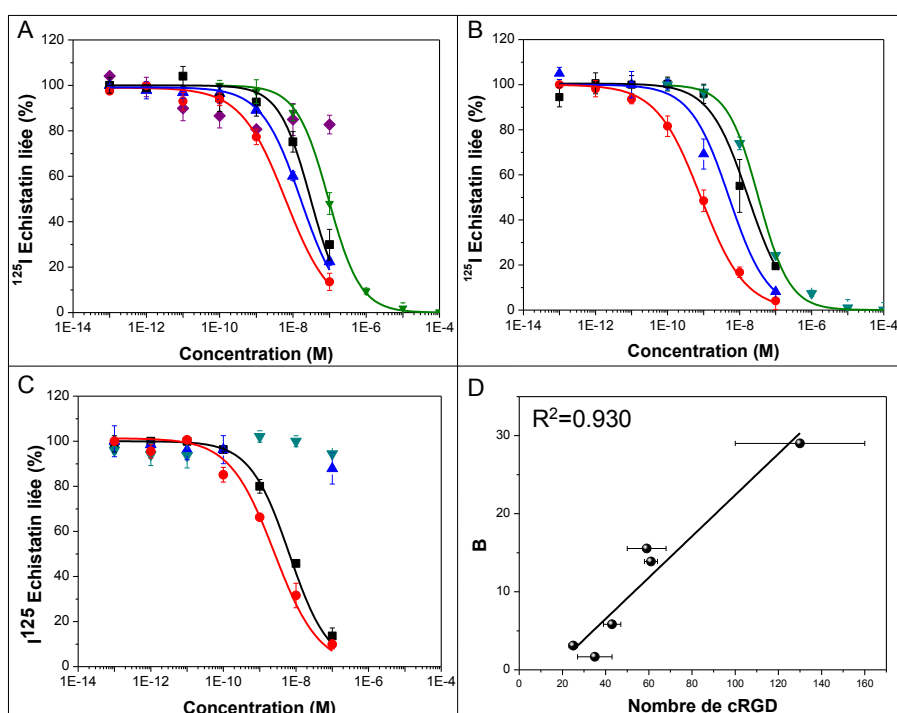


Figure 34 : ¹²⁵I-echistatine a été ajoutée à une concentration finale de 0.05 nM en présence de nombreux ligands compétiteurs. Après 3h, les puits sont lavés et la radioactivité est mesurée. Les ligands étudiés sont (A) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ (violet), cRGDfK (vert), $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -cRGD pour un rapport R=0.2 (noir), R=2 (bleu), R=20 (rouge) ; (B) cRGDfK-PEG₂-NH₂ (vert) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ -(PEG-cRGD) pour un rapport R=0.2 (noir), R=2 (bleu), R=20 (rouge) ; (C) Nanoplateformes multimodales avec deux (rouge) et trois (noir) étapes de fonctionnalisation et leurs blancs respectifs (vert) et (bleu) ; (D) Evolution du facteur B en fonction du nombre de cRGD

	R (MW)	Nb RGD (OPA)	% RGD	IC50 (nM)	K _i (nM)	β
cRGDfK	0	-	-	93	76	-
	0.2	25 ± 2	2 ± 0.2	30	24	3.1
	2	43 ± 4	4 ± 0.4	16	13	5.8
	20	59 ± 9	5 ± 1	6	5	16
c(RGDfK)- PEG-NH ₂	0	-	-	32	26	-
	0.2	35 ± 8	3 ± 1	17	14	1.9
	2	61 ± 3	6 ± 0.3	5	4	6.4
	20	130 ± 30	12 ± 3	0.8	0.7	40

Tableau 13 : IC50, K_i et facteur β obtenus par dosage par compétition des nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ -cRGD et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ -(PEG-cRGD) pour des ratios R=0, R=0.2, R=2 and R=20

Ainsi, les différentes nanoplateformes synthétisées ont été caractérisées et leur affinité vis-à-vis des intégrines a été démontrée. Ces étapes préliminaires permettent d'envisager des futures manipulations biologiques (*in vitro* ou *in vivo*) Le cRGDfK est le peptide de référence pour le ciblage, cependant d'autres ligands, beaucoup moins étudiés, peuvent être utilisés.

VI. Vers les peptidomimétiques

Comme décrit dans le chapitre 1, des peptidomimétiques RGD peuvent être exploités pour le ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$. Leur conception a pour objectif de conduire à des mimes du peptide RGD moins coûteux, plus résistants aux dégradations biologiques et présentant une affinité identique si ce n'est plus importante vis-à-vis des intégrines grâce à une optimisation de leur structure.³⁴ Dans le cadre du projet ANR, financeur de ma bourse de thèse, l'élaboration de peptidomimétiques a été réalisée par le Dr J. Perard (Université Paris Descartes, UMR 8638) en se basant sur une simulation docking *in silico* réalisée par le Dr N. Dupont (Université Paris 13, UMR 7244). Cette simulation, obtenue à l'aide du logiciel CCDC GOLD³⁵, tient compte des interactions ligand-protéine, et permet d'optimiser et de valider les nouvelles propositions structurales.

Les mimes développés présentent un groupement pyrrolidinone substitué par des groupements guanidine et acide carboxylique, mimant respectivement l'arginine et l'acide aspartique ainsi qu'une fonction amine nécessaire pour le couplage sur la nanoplateforme. L'optimisation de leur structure a été étudiée par simulation docking en modifiant la longueur de chaîne entre les deux groupements servant à la reconnaissance des intégrines, leur position ainsi que le centre de stéréochimie, Figure 35.

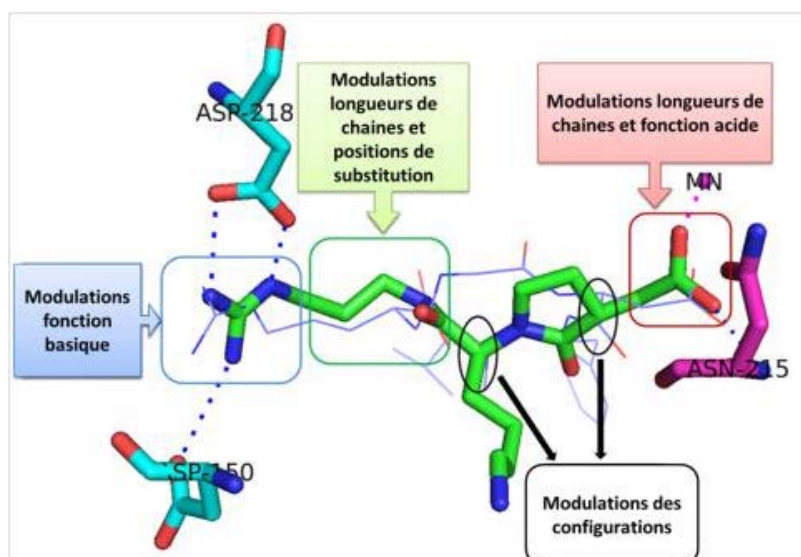


Figure 35 : Structure de base du peptidomimétique comprenant une fonction guanidine (bleue) et une fonction acide carboxylique (rouge) reliées par un groupement pyrrolidinone et modifications possibles en vue de l'optimisation de cette structure

Les résultats de docking obtenus ont conduit à la synthèse de différents composés, Figure 36. Leur affinité vis-à-vis des intégrines $\alpha_v\beta_3$ a ensuite été évaluée par dosage de liaisons sur support solide en présence du compétiteur radioactif, l' ^{125}I -Echistatine. La Figure 36 montre les résultats obtenus. Le composé 10b présente la meilleure IC_{50} ($50\mu\text{M}$), ce qui est en accord avec les études de docking, mais celle-ci reste relativement faible en comparaison avec le peptide cyclique de référence, le cRGDfK ($0.093\mu\text{M}$).

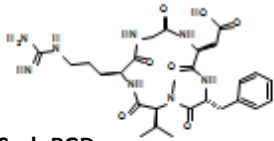
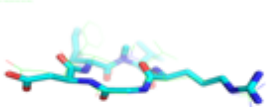
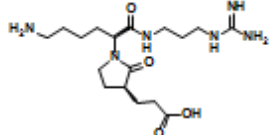

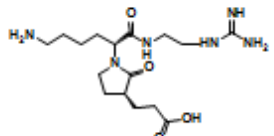
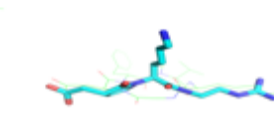
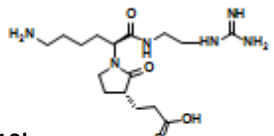
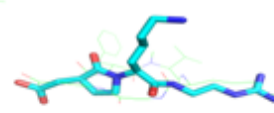
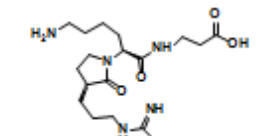
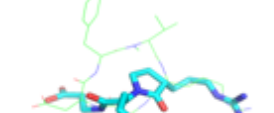
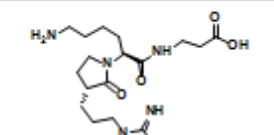
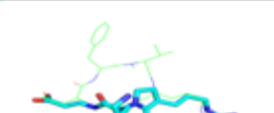
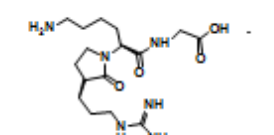
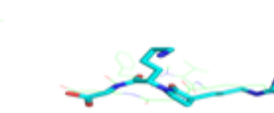
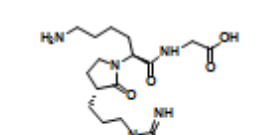
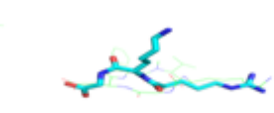
Structure Chimique	Gold score fitness	Superposition avec le ligand de référence (cycloRGD)	IC50
 CycloRGD	78.41		cRGDfK 0.093 μM
	55.34		non évaluée
19a 	74.99		>100 μM
19b 	72.09		#
10a 	73.72		#
10b 	Meilleur Score 87.86		50 μM
12a 	76.52		#
12b 	72.92		non évaluée

Figure 36 : Structure chimique des mimes, simulation docking et résultats d'IC50 obtenus par dosage de liaisons

Le mime présentant la meilleure affinité (composé 10b, Figure 36) a été greffé à la surface de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ et l'affinité a été évaluée, Figure 37. Le nombre de molécules

couplées en surface (65 ± 2) a été évalué par dosage OPA. Cependant, même en tenant compte de l'effet coopératif, observé précédemment sur les nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ -cRGD et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ -(PEG-cRGD), l'affinité de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ -Mime n'a pas pu être détectée dans la gamme de concentrations utilisable lors du dosage de liaisons. (10^{-14} à 10^{-7} M en nanoparticules).

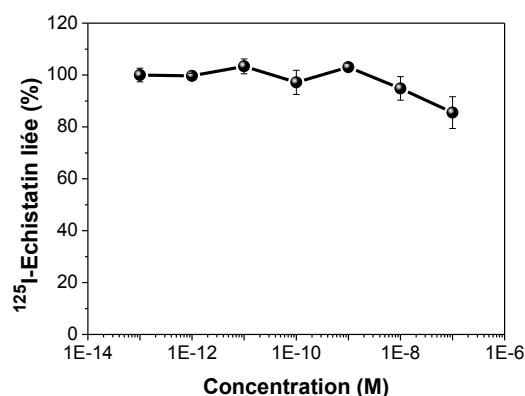


Figure 37 : Résultat de l'affinité de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ -Mime

En conclusion, nous avons ainsi couplé différentes molécules (Fluorophore, PEG, RGD) sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$. Le couplage a été optimisé sur chaque molécule séparément et son efficacité a pu être évaluée par différentes techniques (spectroscopies fluorescence, infrarouge, méthode de dosage des fonctions amines). Ces étapes préliminaires ont servi de base à l'élaboration de nanoplateformes multimodales utilisables pour la double imagerie (fluorescence et IRM). Ces nanoplateformes stables d'un point de vue biologique ont montré des propriétés d'agent de contraste IRM T2 qui sont peu modifiées en couplant les différentes entités. Par ailleurs, l'affinité de ces agents de contraste vis-à-vis des intégrines a été évaluée principalement par une méthode de dosage des liaisons sur support solide, utilisable quel que soit le type de nanoplateforme, en comparaison avec la méthode de mesure par BIAcore. L'élaboration de peptidomimétiques n'a pas conduit à une amélioration de l'affinité (comparée au cRGDfK) et doit être optimisée. Pour compléter cette étude, des évaluations biologiques permettront d'évaluer l'efficacité de ces nanoplateformes *in vitro* et *in vivo* et seront détaillées dans le chapitre 5.

Références Bibliographiques

1. M. Di Marco, C. Sadun, M. Port, I. Guilbert, P. Couvreur, and C. Dubernet, *Int. J. Nanomed.*, 2007, **2**, 609.
2. T. J. Daou, S. Begin-Colin, J. M. Greneche, F. Thomas, A. Derory, P. Bernhardt, P. Legaré, and G. Pourroy, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 4494–4505.
3. F. Geinguenaud, I. Souissi, R. Fagard, L. Motte, and Y. Lalatonne, *Nanomedicine*, 2012, **8**, 1106–1115.
4. Y. Sahoo, H. Pizem, T. Fried, D. Golodnitsky, L. Burstein, C. N. Sukenik, and G. Markovich, *Langmuir*, 2001, **17**, 7907–7911.
5. Y. Lalatonne, C. Paris, J. M. Serfaty, P. Weinmann, M. Lecouvey, and L. Motte, *Chem. Commun.*, 2008, 2553–2555.
6. D. Portet, B. Denizot, E. Rump, J.-J. Lejeune, and P. Jallet, *J. Colloid Interface Sci.*, 2001, **238**, 37–42.
7. Y. Lalatonne, J. Richardi, and M. P. Pileni, *Nat. Mater.*, 2004, **3**, 121–125.
8. E. Dubois, R. Perzynski, F. Boué, and V. Cabuil, *Langmuir*, 2000, **16**, 5617–5625.
9. C. De Montferrand, L. Hu, I. Milosevic, V. Russier, D. Bonnin, L. Motte, A. Brioude, and Y. Lalatonne, *Acta Biomater.*, 2013, **9**, 6150–6157.
10. G. M. Lombardo, G. Portalone, U. Chiacchio, A. Rescifina, and F. Punzo, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 14337–14344.
11. F. Borges, J. L. F. C. Lima, I. Pinto, S. Reis, and C. Siquet, *Helv. Chim. Acta*, 2003, **86**, 3081–3087.
12. H. Gulley-Stahl, P. A. Hogan, W. L. Schmidt, S. J. Wall, A. Buhrlage, and H. A. Bullen, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, **44**, 4116–4121.
13. I. A. Janković, Z. V. Saponjić, E. S. Dzunuzović, and J. M. Nedeljković, *Nanoscale Res. Lett.*, 2010, **5**, 81–88.
14. W. J. Barreto, R. A. Ando, B. M. Estevão, and K. P. da S. Zanoni, *Spectrochim. Acta A*, 2012, **92**, 16–20.
15. M. D. Shultz, J. U. Reveles, S. N. Khanna, and E. E. Carpenter, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 2482–2487.
16. P. Z. Araujo, P. J. Morando, and M. A. Blesa, *Langmuir*, 2005, **21**, 3470–3474.
17. S. T. Martin, J. M. Kesselman, D. S. Park, N. S. Lewis, and M. R. Hoffmann, *Environ. Sci. Technol.*, 1996, **30**, 2535–2542.
18. C. de Montferrand, Y. Lalatonne, D. Bonnin, N. Lièvre, M. Lecouvey, P. Monod, V. Russier, and L. Motte, *Small*, 2012, **8**, 1945–1956.
19. K. Nadeem, H. Krenn, T. Traussnig, R. Wurschum, D. V. Szabo, and I. Letofsky-Papst, *J. Appl. Phys.*, 2012, **111**, 113911–113911.
20. J.-F. Berret, N. Schonbeck, F. Gazeau, D. El Kharrat, O. Sandre, A. Vacher, and M. Airiau, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 1755–1761.
21. T. Hyeon, S. S. Lee, J. Park, Y. Chung, and H. B. Na, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 12798–12801.
22. A. Demortiere, P. Panissod, B. P. Pichon, G. Pourroy, D. Guillon, B. Donnio, and S. Begin-Colin, *Nanoscale*, 2011, **3**, 225–232.
23. L. Xiao, J. Li, D. F. Brougham, E. K. Fox, N. Feliu, A. Bushmelev, A. Schmidt, N. Mertens, F. Kiessling, and M. Valldor, *ACS nano*, 2011, **5**, 6315–6324.
24. B. Basly, G. Popa, S. Fleutot, B. P. Pichon, A. Garofalo, C. Ghobril, C. Billotey, A. Berniard, P. Bonazza, and H. Martinez, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 2146–2157.
25. T. Rajh, L. X. Chen, K. Lukas, T. Liu, M. C. Thurnauer, and D. M. Tiede, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 10543–10552.
26. F. Benyettou, E. Guenin, Y. Lalatonne, and L. Motte, *Nanotechnology*, 2011, **22**, 055102.

27. F. Bertorelle, C. Wilhelm, J. Roger, F. Gazeau, C. Ménager, and V. Cabuil, *Langmuir*, 2006, **22**, 5385–5391.
28. U. Hersel, C. Dahmen, and H. Kessler, *Biomaterials*, 2003, **24**, 4385–4415.
29. Y. Liu, Y. Pan, and Y. Xu, *J. Biomol. Scree.*, 2010, **15**, 131–137.
30. K. A. Krohn and J. M. Link, *Nucl. Med. Biol.*, 2003, **30**, 819–826.
31. M. Mammen, S.-K. Choi, and G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, **37**, 2754–2794.
32. E. V. Piletska and S. A. Piletsky, *Langmuir*, 2010, **26**, 3783–3785.
33. T. Soukka, H. Härmä, J. Paukkunen, and T. Lövgren, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 2254–2260.
34. M. E. Duggan, L. T. Duong, J. E. Fisher, T. G. Hamill, W. F. Hoffman, J. R. Huff, N. C. Ihle, C.-T. Leu, R. M. Nagy, J. J. Perkins, S. B. Rodan, G. Wesolowski, D. B. Whitman, A. E. Zartman, G. A. Rodan, and G. D. Hartman, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 3736–3745.
35. M. L. Verdonk, J. C. Cole, M. J. Hartshorn, C. W. Murray, and R. D. Taylor, *Proteins*, 2003, **52**, 609–623.

Chapitre 3

Fonctionnalisation des nanoparticules par Chimie des Carbodiimides et Chimie click : Etude comparative

Dans ce chapitre, nous comparons l'efficacité du couplage de molécules par chimie des carbodiimides ou par chimie click (réaction de Huisgen ou réaction thiol-yne). Deux molécules de la famille des bisphosphonates qui diffèrent par leur fonction terminale, fonction acide carboxylique ou fonction alcyne, ont été synthétisées et sont utilisées pour la fonctionnalisation de surface des nano-complexes γ -Fe₂O₃. Ces fonctions réactives servent par la suite aux couplages de différentes biomolécules (Fluorophore, PEG, et RGD). L'évaluation de la stabilité en milieu biologique des nanoparticules synthétisées, leur potentiel en tant qu'agent de contraste et leur affinité vis-à-vis des intégrines, selon la stratégie de couplage, sont étudiés.

I. Les bisphosphonates

Les bisphosphonates sont connus depuis le 19^{ème} siècle en tant qu'adoucisseur d'eau dans les systèmes d'irrigation. Depuis les années 1960, ils sont utilisés pour le traitement de maladies osseuses telles que l'ostéoporose, la maladie de Paget, ou comme inhibiteurs de la prolifération des métastases osseuses. Du point de vue de leur structure, les bisphosphonates sont des analogues structuraux stables du pyrophosphate, régulateur naturel endogène de la minéralisation osseuse, où l'atome d'oxygène de la fonction phosphodiester (P-O-P) est remplacé par un carbone central (P-C-P) sur lequel se substitue deux chaînes latérales R1 et R2. Cependant à la différence du pyrophosphate, ils ne sont pas hydrolysés par les enzymes (telles que la phosphatase alcaline) leur conférant ainsi une plus grande stabilité. Tous deux présentent de nombreux atomes d'oxygène qui après ionisation sont capables de chélater les cations divalents (Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺), ce qui explique la forte affinité pour l'hydroxyapatite, composant essentiel du squelette, Figure 1. La chaîne R2 conditionne fortement les propriétés biologiques et pharmacologiques alors que la chaîne R1 influence leur mode de chélation vis-à-vis des cations divalents. Ainsi, lorsque cette chaîne se compose d'un atome d'hydrogène, Figure 1A, une structure bidentate avec les ions métalliques divalents par coordination d'un atome d'oxygène de chaque groupe phosphonate avec le cation est attendue. L'introduction d'un groupement hydroxyle permet la formation d'un complexe tridentate avec les métaux divalents, Figure 1B.

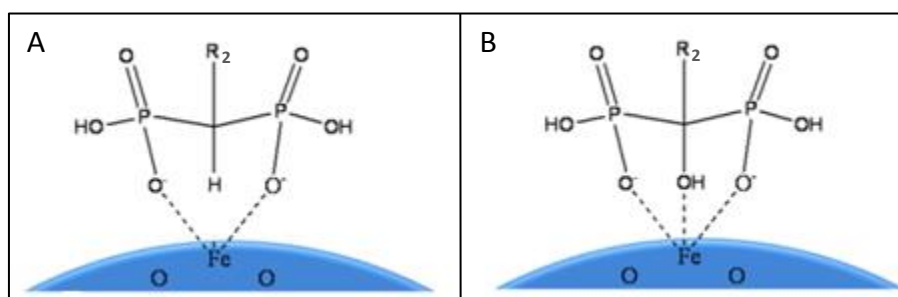


Figure 1 : Proposition de complexation de surface des bisphosphonates sur des nanoparticules lorsque (A) $R_1=H$ ou (B) $R_1=OH$

Ainsi, c'est pour leur propriété de chélatants du fer que des molécules de la famille des HydroxyMéthylèneBisPhosphonates (HMBP) ont été utilisées pour fonctionnaliser la surface des nanoparticules de maghémite. Les deux bisphosphonates, synthétisées au laboratoire, diffèrent par leur fonction réactive terminale : une fonction acide carboxylique pour l'acide 5-hydroxy-5,5-diphosphonopentanoïque (HMBP-COOH), et une fonction alcyne pour l'acide 1-hydroxyhept-6-yne-1,1-diylidiphosphonique (HMBP-C \equiv CH). Ces molécules sont constituées de plusieurs charges avec quatre valeurs de pKa pour les fonctions acides phosphoniques (0.8, 2.2, 6.3, 10.9 pour P-OH/P-O⁻), auquel s'ajoute, pour le HMBP-COOH, celui de la fonction carboxylique (4.8 pour COOH/COO⁻).

Leur synthèse est réalisée selon un protocole décrit Figure 2.^{1,2} Deux équivalents de tris(triméthylsilyl)phosphite sont additionnés sous atmosphère inerte, à -20°C, à un chlorure d'acide. Après suivi de l'évolution de la réaction par RMN ^{31}P { 1H }, les fractions volatiles sont évaporées sous pression réduite. L'hydrolyse du mélange est ensuite réalisée dans du méthanol à température ambiante. La synthèse du HMBP-COOH requiert une étape supplémentaire de saponification afin d'obtenir le composé voulu. Une fois purifié, les bisphosphonates sont caractérisés par RMN 1H , ^{31}P , ^{13}C . Les différentes synthèses et caractérisations sont détaillées en Annexe 5. Par cette méthode, les produits sont obtenus avec des rendements satisfaisants, Tableau 1.

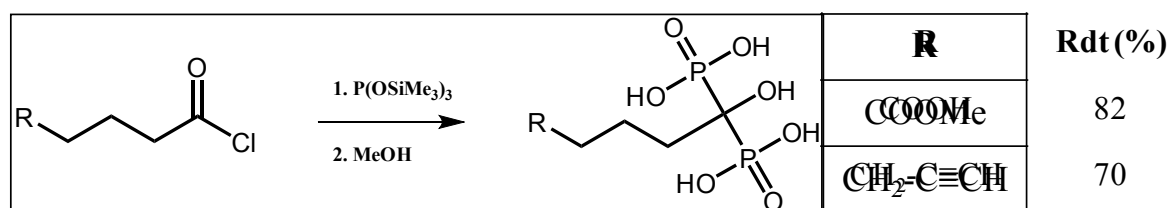


Figure 2 : Synthèse des bisphosphonates

	Formule chimique	Rendement (%)
HMBP-COOH		82
HMBP-C≡CH		70

Tableau 1 : Structure, et rendement des bisphosphonates synthétisés

II. Synthèse, fonctionnalisation de la surface et caractérisation des nanoparticules

II. 1. Synthèse et fonctionnalisation de surface

Les nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sont synthétisées en système micellaire direct (cf chapitre 2). Pour la fonctionnalisation de surface, les bisphosphonates sont ajoutés à la solution de nanoparticules à pH acide (pH 2). Dans ces conditions, les nanoparticules sont chargées positivement et les bisphosphonates négativement. La fonctionnalisation de surface est réalisée sous agitation magnétique à température ambiante pendant deux heures. Les nanocristaux sont ensuite séparés du surnageant par précipitation sur un aimant à pH acide. L'opération est répétée cinq fois. Après les lavages, les nanoparticules « habillées » sont redispersées dans l'eau à pH physiologique. On obtient ainsi différents ferrofluides stables à pH neutre $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-COOH}$, et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-C}\equiv\text{CH}$.

II. 2. Caractérisation

Les deux nanoplatformes, $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-COOH}$ et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-C}\equiv\text{CH}$, ont été caractérisés par MET, Figure 3. Leur taille moyenne et leur polydispersité sont respectivement 9 nm et 0.2 ($w_0=1.8\text{nm}$).

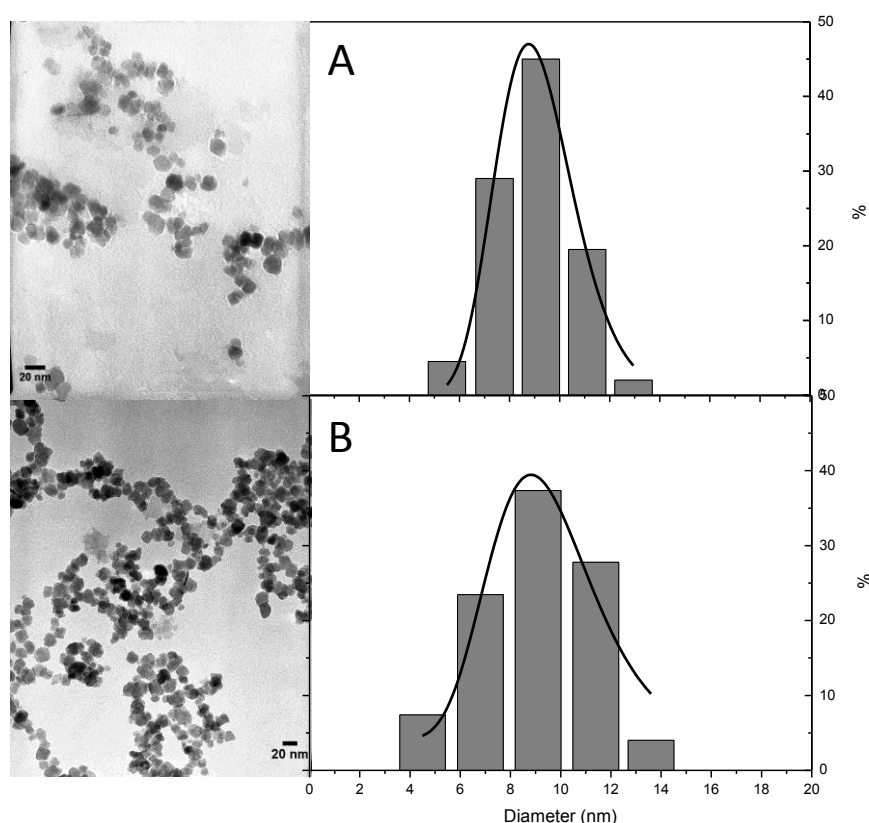


Figure 3 : Clichés MET et distribution en taille des nanoparticules (A) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-COOH}$, et (B) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-C}\equiv\text{CH}$

L'état de surface est caractérisé d'un point de vue qualitatif par spectroscopie infrarouge. La Figure 4 présente les spectres infrarouges (pastilles KBr) des ligands et des nanoparticules après fonctionnalisation. Les spectres infrarouges des bisphosphonates présentent des bandes, entre 900 et 1200 cm^{-1} , de vibrations larges et intenses correspondant aux liaisons P-O et P=O. De plus, pour le HMBP-COOH, on remarque les bandes caractéristiques des ions carboxylates à 1573 (asymétrique) et 1411 (symétrique) cm^{-1} .³ Les spectres des nanocomplexes formés mettent en évidence plusieurs changements confirmant la fonctionnalisation des nanoparticules. On observe notamment l'apparition d'une large bande à 600 cm^{-1} , qui correspond à la vibration de la liaison Fer-Oxygène à la surface des particules et un déplacement vers les faibles longueurs d'ondes des bandes de vibrations des liaisons phosphonates P-O et P=O, indiquant de fortes interactions entre la molécule et la surface des nanoparticules. Ceci confirme la complexation de surface sur la nanoplateforme via les bisphosphonates.

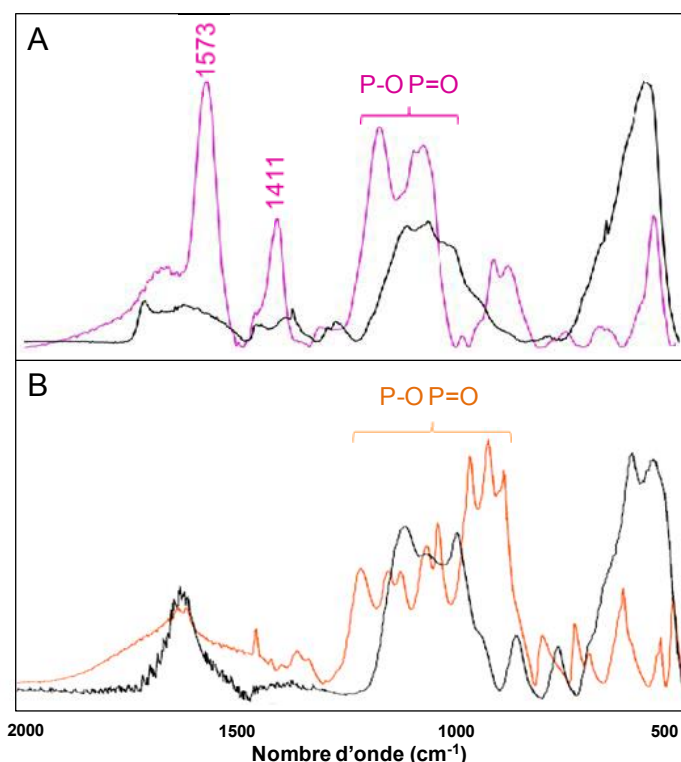


Figure 4 : Spectres infrarouges des ligands (A) HMBP-COOH (violet) et (B) HMBP-C≡CH (orange) et des nanoplateformes "habillées" (noir)

Les mesures de la taille hydrodynamique et du potentiel de surface des deux nanoplateformes en fonction du pH sont présentées Figure 5. Dans les deux cas, le PIE est situé aux alentours de pH 2. Lorsque le pH est supérieur à 2, la charge moyenne de surface est négative. Les mesures de tailles hydrodynamiques montrent que les nanoparticules « habillées » sont stables sur une gamme importante de pH, entre pH 4 et pH 11. A pH 2, seules deux fonctions phosphonates sont déprotonées et engagées dans la complexation de surface des nanoparticules. Ainsi, pour les deux nanoplateformes, à bas pH, les répulsions électrostatiques entre nanoparticules sont faibles voir nulles, les particules s'agrègent. Lorsque le pH augmente, les autres fonctions phosphonates et/ou acide carboxylique se déprotonent ce qui induit l'apparition de charges négatives à la surface des particules. Ces interactions électrostatiques répulsives entre nanoparticules permettent d'obtenir une stabilité colloïdale à partir d'un pH de l'ordre de 4. Le potentiel Zeta et la taille hydrodynamique à pH neutre de chaque nanoplateforme sont reportés dans le Tableau 2. On remarque que la taille hydrodynamique est très proche de la taille cristalline (9 nm), ce qui confirme un état d'agrégation faible et une stabilité colloïdale à pH physiologique.

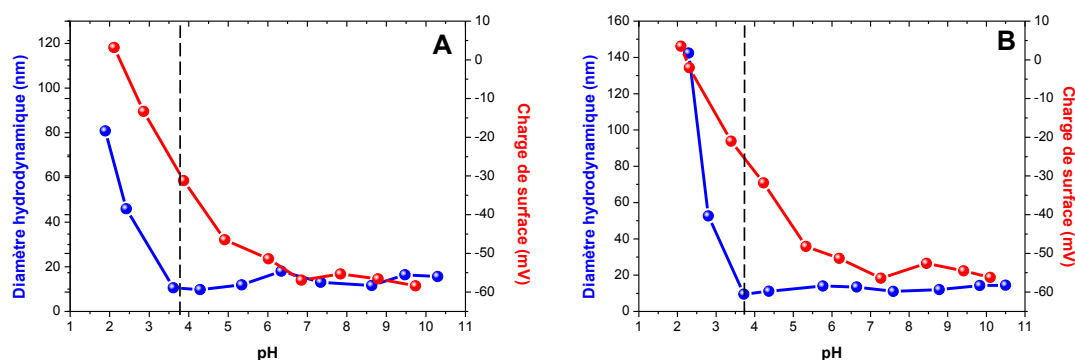


Figure 5 : Diamètre hydrodynamique et potentiel de surface en fonction du pH des nanoparticules fonctionnalisées par HMBP-COOH (A) et HMBP-C≡CH (B)

	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-COOH}$	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-C}\equiv\text{CH}$
D_h (nm)	11.4 ± 3 PdI : 0.3	10.2 ± 3 PdI : 0.3
Zeta (mV)	-56 ± 7	-52 ± 8

Tableau 2 : Tailles hydrodynamiques et potentiels Zeta à pH neutre des nanoplateformes "habillées"

En ce qui concerne leurs propriétés magnétiques, les signatures VSM et MIAplex® des nanoparticules après greffage (à pH 7) sont représentées Figure 6 et attestent d'un comportement superparamagnétique. L'aimantation à saturation est relativement proche puisqu'elle est de 43 et 47 emu/g respectivement pour $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-COOH}$, et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-C}\equiv\text{CH}$, et concorde avec celle obtenue pour la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ (chapitre 2, 48 emu/g). Les courbes ZFC-FC, quant à elles, permettent de mettre en évidence une température de blocage de 202 et 215 K respectivement pour $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-COOH}$, et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-C}\equiv\text{CH}$, témoignant de fortes interactions entre les particules, menant à une magnétisation collective. La plus faible température de blocage obtenue pour la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-COOH}$ pourrait cependant témoigner d'interactions dipolaires légèrement plus faibles.

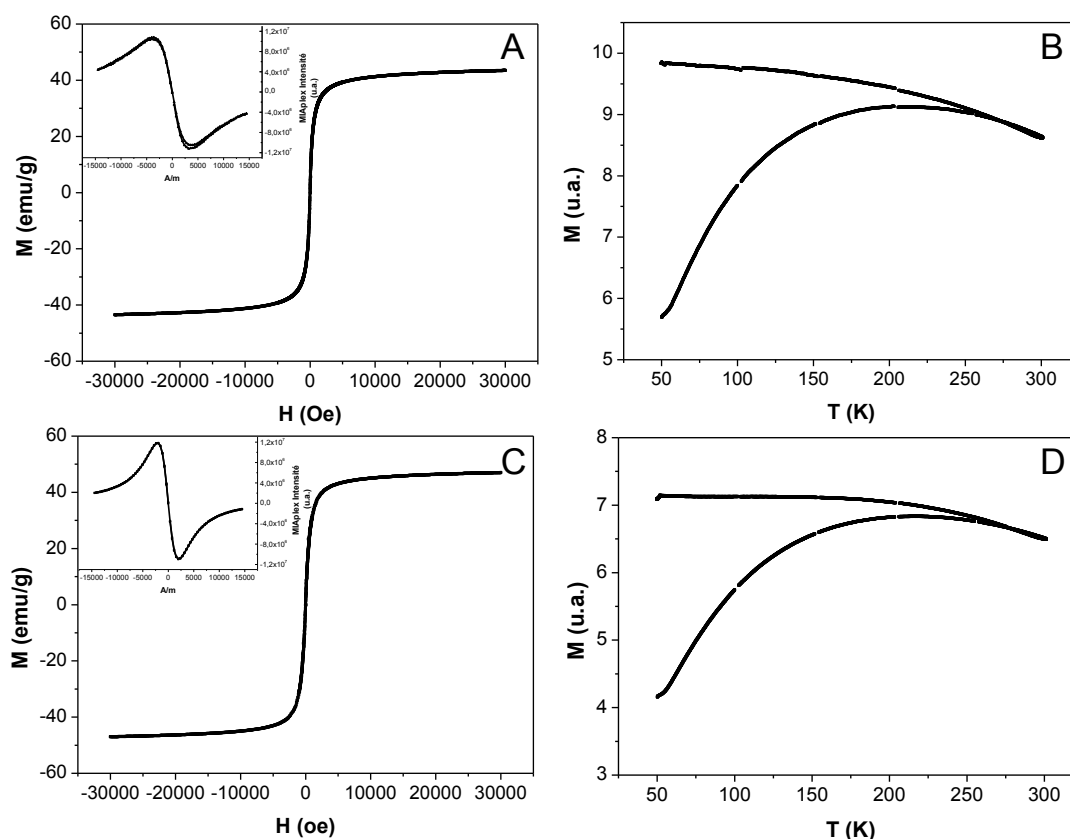


Figure 6 : Signatures VSM (sous forme de poudre) et MIAPlex® (normalisées / mg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en insert des nanoparticules (A) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@HMBP-COOH$, et (C) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@HMBP-C\equiv CH$; Courbes ZFC-FC (sous forme de poudre) des nanoparticules (B) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@HMBP-COOH$ et (D) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@HMBP-C\equiv CH$

Le potentiel de ces nanoplateformes en tant qu'agent de contraste T2 a été évalué sur un IRM clinique 1.5T. Les images T2 obtenues à différentes concentrations sont présentées Figure 7. Les relaxivités r_2 ont été calculées et sont de $127 \pm 1 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et de $179 \pm 5 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ respectivement pour $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@HMBP-COOH$ et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@HMBP-C\equiv CH$. Cette dernière valeur est proche de la relaxivité r_2 obtenue pour la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ ($186 \pm 5 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Outre les propriétés magnétiques du noyau, la couche de surface peut affecter le contraste IRM des nanoparticules. La relaxivité est déterminée par la diffusion transverse des molécules d'eau dans le champ magnétique autour des nanoparticules, les agents de surface peuvent ainsi jouer un rôle en excluant l'eau du cœur magnétique, en gênant la diffusion des molécules d'eau ou en augmentant leur temps de résidence en formant des liaisons hydrogènes.⁴ Les différences observées entre les différentes nanoplateformes pourraient alors être influencées par la nature de la fonction terminale. En effet, une étude menée par Tong *et al.* a montré que les groupes fonctionnels présents sur la surface de nanoparticules pouvaient influencer les temps de relaxation T2.⁵ De plus, l'équipe d'Abbasi *et al.*⁶ a montré que la relaxivité augmente avec

les interactions dipolaires, pouvant ainsi expliquer la plus faible relaxivité observée pour la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-COOH}$.

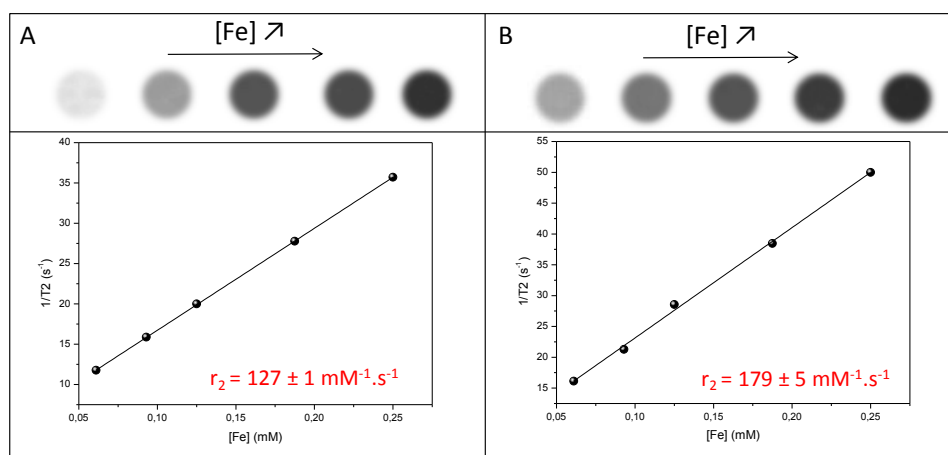


Figure 7 : Images T2 obtenues sur un IRM clinique 1.5T aux concentrations $c\text{Fe}=0.061$; 0.093 ; 0.125 ; 0.188 ; 0.25 mM ($\text{TR}=2000 \text{ ms}$ et $\text{TE}=20 \text{ ms}$) et relaxivités R_2 obtenues pour (A) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-COOH}$ et (B) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-C}\equiv\text{CH}$

II. 3. Quantification des ligands adsorbés

La détermination du nombre de ligands adsorbés à la surface des nanoparticules a été réalisée par analyse thermogravimétrique (ATG) mais également par énergie dispersive de rayons X (EDX) en se basant sur le rapport atomique fer/phosphore (Annexe 2.9). Les courbes ATG et spectres EDX obtenus sont présentés Figure 8 et les résultats sont regroupés dans le Tableau 3.

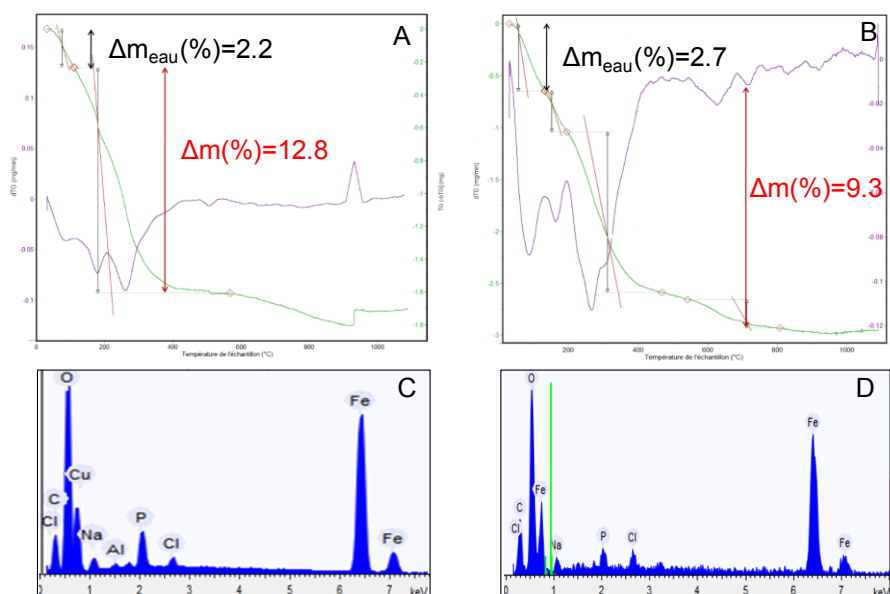


Figure 8 : Courbes d'ATG (vertes) et dérivées (violettées) et spectres EDX des nanoplateformes habillées par (A-C) HMBP-COOH ou par (B-D) HMBP-C \equiv CH

On obtient environ 550 molécules HMBP-COOH et 440 molécules HMBP-C≡CH par nanoparticule, ce qui correspond à une surface occupée de 46 Å² et 58 Å² respectivement. Ce taux de couverture est en accord avec la littérature (50 à 62 Å²)^{7,8}

	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-COOH}$	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH}$
ATG	560 ± 50	400 ± 40
EDX	550 ± 30	440 ± 40

Tableau 3 : Résultats ATG et EDX pour les différentes nanoplateformes

III. Comparaison du couplage par chimie des carbodiimides et chimie click

Différentes méthodes de couplage ont été utilisées pour la fonctionnalisation de surface des nanoparticules. La plus classique implique la formation d'une liaison amide par chimie des carbodiimides. Ces dernières années l'émergence de la chimie click a eu un large impact sur la fonctionnalisation des nanomatériaux. La réaction la plus utilisée est la réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre 1. De nombreux exemples sur son utilisation pour la fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer sont décrits dans la littérature,^{9,10,11} cependant relativement peu d'études donnent une quantification précise du nombre de molécules couplées.^{12,13,14,15} D'autres réactions de chimie click ont également été répertoriées : des additions de Michael¹⁶, les réactions thiol-ène¹⁷ ou thiol-yne.¹⁸ Ainsi, dans cette partie, nous avons voulu comparer l'efficacité de couplage de différentes molécules par chimie des carbodiimides et chimie click (cycloaddition ou réaction thiol-yne). Cette étude a été réalisée sur des nanoparticules de même composition, de même taille, et complexées en surface par un agent de type bisphosphonate ne différant que par sa fonction réactive terminale. Des nanoparticules d'oxyde de fer présentant en surface des fonctions terminales acides carboxyliques ou alcynes ont donc été synthétisées et caractérisées. Les groupements fonctionnels sont utilisés pour le couplage de fluorophores, de chaînes PEG, et de molécules reconnaissant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (cycloRGD). L'effet des micro-ondes, entre la chimie des carbodiimides et la cycloaddition, a été étudié lors du couplage de fluorophores.

III. 1. Protocoles de couplage

En ce qui concerne le couplage par chimie des carbodiimides, le protocole utilisé a été décrit dans le chapitre 2. Pour rappel, la fonction amine présente sur la molécule réagit avec la fonction acide carboxylique sur la nanoplateforme, formant ainsi une liaison amide. Le couplage se fait suivant un mécanisme en deux étapes : une première étape d'activation des fonctions acides carboxyliques à pH acide puis le couplage à proprement parlé à pH basique.

Pour la voie « chimie click » (cf chapitre 1), la réaction de cycloaddition 1,3 de Huisgen catalysée par le cuivre (I) a été utilisée pour les couplages de fluorophores et de peptides RGD, et la réaction thiol-yne, pour le couplage de chaînes PEG, Figure 9. Les protocoles expérimentaux sont détaillés ci-dessous.

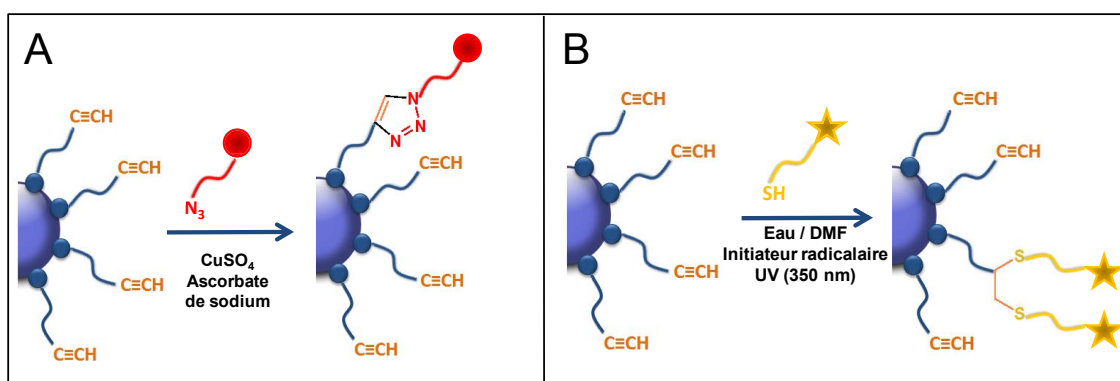


Figure 9 : Couplage par chimie click sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-C}\equiv\text{CH}$ selon (A) la réaction de cycloaddition de Huisgen ou (B) la réaction thiol-yne

Lors de la réaction de cycloaddition de Huisgen, les fonctions azides et alcynes, présentes respectivement sur la molécule d'intérêt et sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-C}\equiv\text{CH}$ réagissent en présence d'un catalyseur, ce qui conduit à la formation d'un cycle triazole, Figure 9A. La molécule d'intérêt, le sulfate de cuivre (5%) et l'ascorbate de sodium (30%) sont ajoutés à une solution aqueuse de nanoparticules à pH neutre. L'ascorbate de sodium a été utilisé afin de réduire le cuivre (II) (CuSO_4) en cuivre (I). Une fois le couplage terminé, des lavages sont effectués à pH 2 afin d'éliminer les molécules qui n'ont pas réagi. Les nanoparticules ainsi modifiées sont redispersées dans l'eau à pH physiologique et les diverses caractérisations sont effectuées.

Lors de la réaction thiol-yne (réaction radicalaire), Figure 9B, les fonctions thiols et alcynes, présentes respectivement sur la molécule PEG et sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-}$

$C\equiv CH$ réagissent pour former des liaisons carbone-soufre. Les nanoparticules et les chaînes PEG sont dispersées dans un mélange eau/diméthylformamide (50/50). L'initiateur radicalaire, la 1-hydroxycyclohexylphénylcétone, est ensuite ajouté et solubilisé. Le mélange réactionnel est agité sous irradiation UV (350 nm). Une fois le couplage terminé, des lavages sont effectués à pH 2 afin d'éliminer les molécules qui n'ont pas réagi. Les nanoparticules ainsi modifiées sont redispersées dans l'eau à pH physiologique et les diverses caractérisations sont effectuées.

Ainsi une première étude comparative a été réalisée entre la chimie des carbodiimides et la réaction de cycloaddition de Huisgen lors du couplage de fluorophores ou de peptides RGD. Dans le premier cas, les conditions opératoires ont été modifiées, en jouant sur deux paramètres : le ratio R, et la source d'énergie, avec ou sans micro-ondes. Le ratio R correspond soit à l'excès de fonctions amines par rapport aux fonctions acides carboxyliques (chimie des carbodiimides), soit à l'excès de fonctions azides par rapport aux fonctions alcynes (chimie click). Pour le couplage des peptides cRGD, la comparaison de la stratégie de couplage a été réalisée pour un ratio ($R=2$) sous micro-ondes. Les conditions opératoires sous micro-ondes sont identiques à celles utilisées précédemment sur la nanoplateforme $\gamma Fe_2O_3@CA$ (chapitre 2, tableau 3).

La seconde étude comparative concerne le couplage de chaînes PEG par chimie des carbodiimides ou par la réaction thiol-yne. Dans le premier cas, les chaînes PEG ont été couplées pour différents ratios R sous micro-ondes. Dans le second cas, les conditions opératoires ont été optimisées en jouant sur le ratio R, qui représente l'excès de fonctions thiols par rapport aux fonctions alcynes, et le temps d'irradiation sous lampe UV.

D'un point de vue pratique, nous pouvons remarquer que la chimie click présente certains avantages par rapport à la chimie des carbodiimides :

- la réaction se fait à pH neutre, ce qui sera intéressant dans le cas de molécules sensibles au pH (en chimie carbodiimide, il faut d'abord activer la fonction acide carboxylique à pH 4 puis réaliser le couplage à pH basique)
- la réaction se fait en une seule étape (contrairement à la chimie des carbodiimides qui en nécessite deux)

Cependant, dans le cas de la réaction thiol-yne, les inconvénients peuvent être reliés à l'utilisation d'un solvant organique (DMF, DMSO) utilisé pour solubiliser l'initiateur radicalaire ou de la lampe UV.

III. 2. Couplages de fluorophores

L'efficacité de couplage de fluorophores selon la méthode utilisée (carbodiimide ou click pour la réaction de cycloaddition) a été comparée à différents ratio ($R=2$ et $R=20$) sous énergie normale et sous énergie micro-ondes. Deux fluorophores ont été utilisés : l'un présente une fonction amine pour le couplage par chimie des carbodiimides, la Rhodamine 123 (R123) et l'autre, dérivé de la Rhodamine B, présente une fonction azide (RN_3) pour le couplage par chimie click, Figure 10. Ces deux fluorophores présentent respectivement une absorption caractéristique à 500 et 552 nm et une émission de fluorescence localisée à 522 et 573 nm. Les spectres infrarouges des deux rhodamines sont présentés Figure 10. Le Tableau 4 indique leurs bandes d'absorption caractéristiques. Il est à noter pour la Rhodamine N_3 l'apparition de bandes intenses 1264, 1097, 1020 et 801 cm^{-1} que nous n'avons pas réussi à attribuer mais qui semble caractéristique de la molécule.

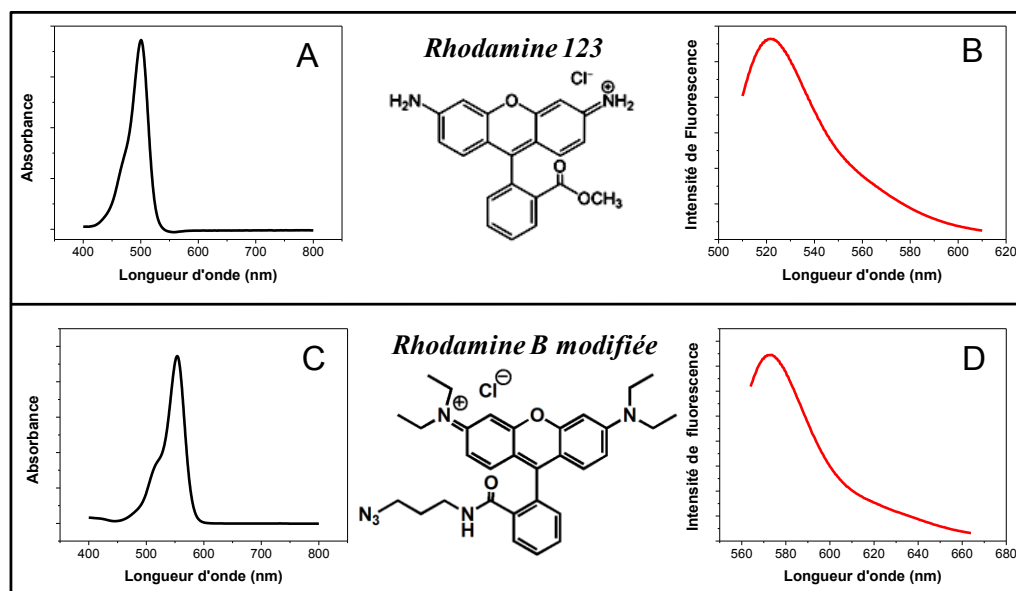


Figure 10 : Spectres d'absorption (A) et de fluorescence (B) de la Rhodamine 123 ; Spectres d'absorption (C) et de fluorescence (D) de la Rhodamine B modifiée

	$\nu\text{C=O}$ (cm^{-1})	Bandes d'absorption des Cycles aromatiques (cm^{-1})	νN_3 (cm^{-1})
R123	1710 (ester)	1650 1475 1595 1411 1540	-
RN₃	1690 (amide)	1631 1543 1617 1515 1587	2092

Tableau 4 : Bandes caractéristiques des fluorophores

Les spectres infrarouges des nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-COOH}$ couplées à la Rhodamine 123 et les nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-C}\equiv\text{CH}$ couplées à la Rhodamine B modifiée sont présentés Figure 11. Les spectres infrarouges pour un ratio R=2 et R=20 à température ambiante étant similaires à celui du ratio R=2 MW n'ont pas été représentés sur la figure.

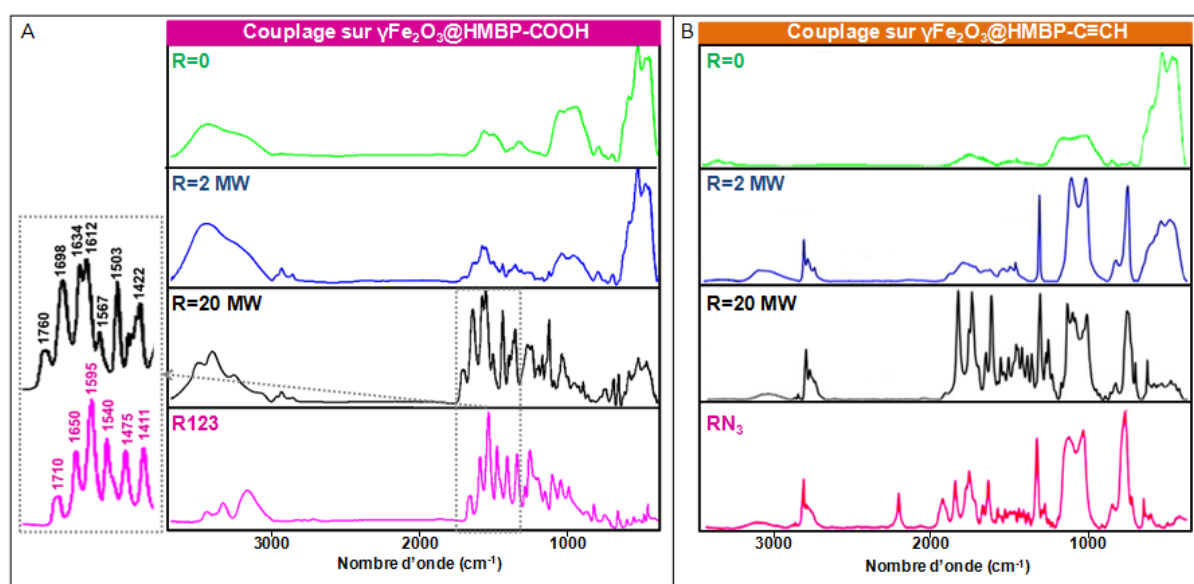


Figure 11 : Spectres infrarouges des fluorophores (en rose) et des nanoplateformes après couplage de la Rhodamine à différents rapports R (R=0 en vert, R=2 MW en bleu et R=20 MW en noir)

Dans le cas de la chimie des carbodiimides, pour un ratio R=2 MW, les spectres des nanoplateformes avant et après couplage diffèrent très peu. On retrouve les bandes caractéristiques des vibrations de valence des groupements phosphonates du HMBP-COOH (entre 900 et 1100 cm^{-1}). Lorsque le rapport R augmente, des changements notables sont observés. Une diminution progressive de la bande de vibration Fer-Oxygène (600 cm^{-1}), ainsi que celle de la bande de vibration des liaisons phosphonates (900-1100 cm^{-1}) est observée. De plus, des différences sont constatées dans la région 1400-1800 cm^{-1} , correspondant aux bandes d'absorption des cycles aromatiques. Sur la nanoplateforme, les bandes caractéristiques de la Rhodamine 123 sont déplacées vers les plus grands nombres d'ondes et on remarque l'apparition d'une nouvelle bande à 1634 cm^{-1} caractéristique de la vibration de valence $\nu\text{C=O}$

des liaisons amides. Ainsi, l'ensemble de ces résultats tend à prouver que la Rhodamine 123 a bien été couplée de manière covalente sur les nanoplateformes.

En ce qui concerne le couplage par chimie click, dès le ratio $R=2$ MW, on remarque l'apparition de pics caractéristiques de la Rhodamine RN_3 . Comme pour le couplage par chimie des carbodiimides, plus le ratio R augmente, plus la bande de vibration Fer-Oxygène (vers 600 cm^{-1}) diminue. De plus, pour le ratio $R=20$ MW, la disparition du pic à 2092 cm^{-1} , correspondant à la fonction azide du fluorophore, prouve la réaction de ce groupement avec les fonctions alcynes présentes sur les nanoplateformes.

D'un point de vue qualitatif, les spectres d'émission de fluorescence des nanocomplexes attestent de la présence de la Rhodamine à la surface des particules, Figure 12. Par comparaison avec les spectres d'émission des fluorophores libres en solution, on remarque un léger déplacement du maximum vers le bleu pour les particules couplées à la Rhodamine 123 (de 522 à 518 nm), et vers le rouge pour les particules couplées à la Rhodamine B modifiée (de 573 à 575 nm), ce qui suggère que le couplage a bien été effectué.

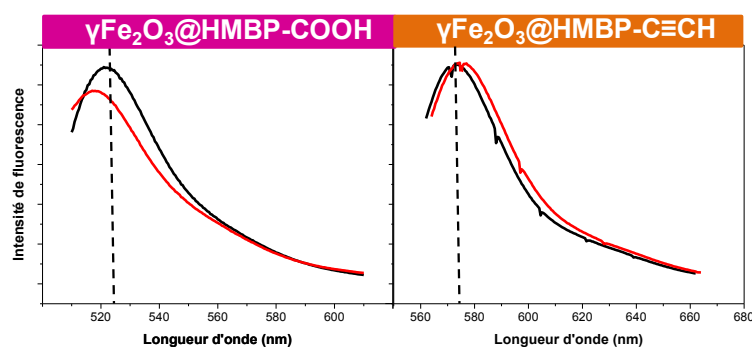


Figure 12 : Spectres d'émission de fluorescence des fluorophores libres en noir et des nanoplateformes fluorescentes en rouge

Le nombre de fluorophores et le taux d'extinction sur les nanoplateformes ont été évalués en mesurant l'intensité de fluorescence sur les nanoplateformes et après désorption des molécules de la surface. Les droites d'étalonnage réalisées sur des solutions de Rhodamine à concentration croissante sont présentées en Annexe 3. L'ensemble des résultats est reporté dans le Tableau 5









	R	Nbre sur nano	Nbre après décrochage	Taux d'extinction	%	Image fluorescence	D _h (nm)	Pdl	Zeta (mV)
Carbodiimide	2	0	1 ± 1	4	0.2 ± 0.2		9.2	0.3	-47 ± 7
	2 MW	1 ± 1	4 ± 1	4	0.7 ± 0.2		13.2	0.3	-37 ± 6
	20	1 ± 1	4 ± 2	4	0.7 ± 0.4		10	0.3	-43 ± 6
	20 MW	6 ± 1	40 ± 4	7	7 ± 1		58	0.3	-43 ± 7
Click	2	2 ± 1	5 ± 2	3	1.1 ± 0.5		8.1	0.3	-43 ± 11
	2 MW	7 ± 3	25 ± 5	4	5.4 ± 0.5		20	0.4	-37 ± 7
	20	9 ± 2	24 ± 2	3	5 ± 1		17.1	0.3	-45 ± 6
	20 MW	36 ± 5	165 ± 11	5	38 ± 3		26	0.5	-45 ± 5

Tableau 5 : Résultats du couplage d'un fluorophore par chimie des carbodiimides et chimie click

Le nombre de molécules greffées à la surface augmente soit avec le ratio R soit avec l'utilisation des micro-ondes. En ce qui concerne le couplage par chimie des carbodiimides, les résultats montrent que le taux de greffage de la Rhodamine R123, sous chauffage classique, reste assez faible. Ainsi, pour un ratio R=20, il est d'environ 0.7%. L'utilisation des micro-ondes permet d'augmenter la quantité de molécules greffées pour un même ratio. Ainsi, on obtient un taux de greffage de l'ordre de 7% pour un ratio R=20.

En ce qui concerne le couplage par « click », on observe de meilleurs résultats. En effet, le rendement est environ 7 fois plus important (environ 5% pour un ratio R=20) sous énergie « normale », et environ 5 fois plus important sous micro-onde (environ 38%) par rapport au couplage par chimie des carbodiimides. Cependant, les plus faibles résultats obtenus par chimie des carbodiimides peuvent être liés à un encombrement stérique plus important. En effet, les cycles aromatiques de la Rhodamine 123 sont proches de la fonction amine réactive contrairement à la Rhodamine B modifiée qui présente un groupement espaceur entre la fonction azide et les cycles aromatiques.

La quantification par fluorescence sur les nanoparticules et sur le surnageant après la désorption des fluorophores, permet de mettre en évidence le taux d'extinction, qui reste relativement stable en fonction du nombre de molécules couplées (entre 3 et 7).

Les photographies prises en microscopie à fluorescence des différents ferrofluides en milieu aqueux illustrent les résultats obtenus par spectroscopie de fluorescence. Ainsi, l'augmentation du nombre de fluorophores sur les nanoparticules est corrélée à une intensité de fluorescence croissante beaucoup plus marquée sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH}$. Ceci est en accord avec un rendement de couplage plus important.

L'évolution du rayon hydrodynamique et du potentiel de surface en fonction du rapport R a été étudiée, et les résultats sont présentés dans le Tableau 5. Dans les deux cas (carbodiimide et click), le potentiel de surface des nanoplateformes reste stable, cependant une augmentation de la taille hydrodynamique est observée lorsque le ratio R augmente. Cette évolution est en accord avec l'augmentation du nombre de Rhodamines couplées à la surface.

L'évolution des propriétés magnétiques, en particulier l'évolution de la signature MIAplex® en fonction du nombre de Rhodamines greffées a été étudiée et les résultats sont présentés, Figure 13. Les signatures magnétiques pour un ratio R=2 et R=20 à température ambiante étant similaires à celui du ratio R=2 MW n'ont pas été représentées sur la figure. Dans tous les cas on retrouve la signature caractéristique d'un comportement superparamagnétique. Cependant, des changements au niveau de l'intensité du signal sont observés. Ainsi, l'amplitude a tendance à diminuer avec le ratio R et donc avec le nombre de fluorophores greffés, pouvant être corrélés à l'augmentation de la taille hydrodynamique des nanocristaux.

Par ailleurs, il est à noter que pour un rapport R=20 sous micro-onde, la taille hydrodynamique ainsi que la diminution du signal MIAplex sont plus faibles sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH}$ alors que le nombre de fluorophores couplés est plus important. Ceci peut être lié à une meilleure stabilité de la plateforme, due à l'éloignement des groupements aromatiques hydrophobes de la nanoplateforme.

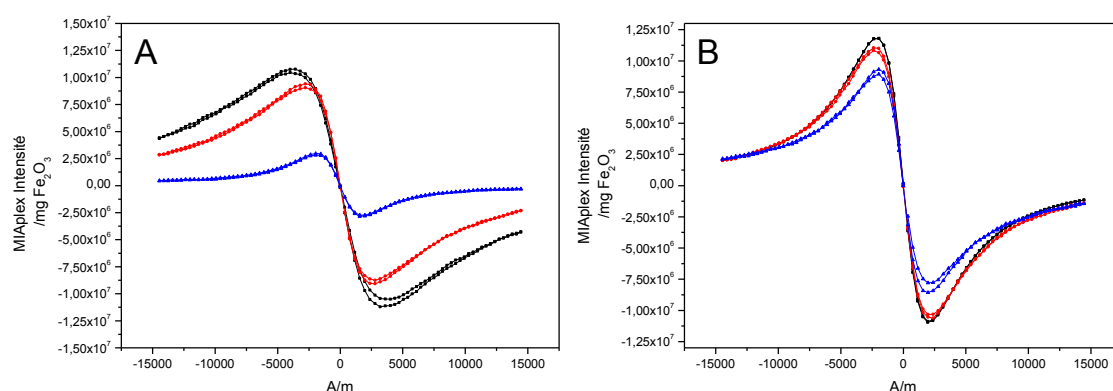


Figure 13: Evolution de la signature MIAplex® (normalisée / mg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en fonction du rapport R (R=0 en noir, R=2 MW en rouge et R=20 MW en bleu) sur (A) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-COOH}$ et (B) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH}$

Ainsi, les résultats obtenus montrent qu'un nombre plus important de fluorophores a pu être couplé sur les nanoparticules par chimie click grâce à la réaction de Huisgen. Cependant la présence du bras espaceur sur la Rhodamine N₃ pourrait avoir une influence sur

ce taux de greffage plus élevé. Ainsi la comparaison chimie des carbodiimides/réaction de Huisgen sera également étudiée lors du couplage de peptides RGD, différant uniquement par leurs fonctions terminales, amine ou azide.

III. 3. Couplages de chaines PEG

Nous avons dans un deuxième temps comparé l'efficacité de couplage de molécules de type PEG par chimie des carbodiimides ou click. Tout d'abord, le choix des chaînes PEG à coupler a été discuté notamment en fonction de la méthode de quantification. Dans le chapitre 2, le couplage par chimie des carbodiimides du $\text{H}_2\text{N-PEG}_4\text{-COOH}$ sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@CA}$ a été caractérisé par deux méthodes : la méthode spectroscopique et la méthode OPA. Dans le cas des bisphosphonates la présence des bandes caractéristiques des vibrations des liaisons phosphates P-O et P=O (entre 900 et 1200 cm^{-1}) ne permet pas d'utiliser cette méthode. En effet, la nanoplateforme absorbe au même endroit que la bande à 1106 cm^{-1} du PEG, correspondant à la vibration de valence $\nu\text{C-O}$ des éthers aliphatiques, utilisée pour la quantification, Figure 14. Ainsi pour le couplage par chimie des carbodiimides, la quantification du nombre de $\text{H}_2\text{N-PEG}_4\text{-COOH}$ sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-COOH}$ a été réalisée à l'aide du réactif OPA.

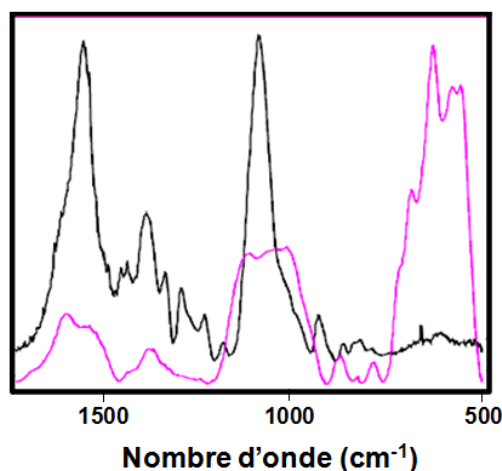


Figure 14 : Comparaison des spectres infrarouges du $\text{H}_2\text{N-PEG-COOH}$ (spectre noir) et de la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-COOH}$ (spectre violet)

Pour la chimie click, différentes méthodes de couplage sont possibles : la réaction de cycloaddition de Huisgen, nécessitant un groupement terminal azide sur le PEG, ou la réaction thiol-yne, nécessitant un groupement terminal thiol. Ainsi pour la comparaison du couplage de chaines PEG, deux PEG ne différant que par leur fonction terminale peuvent être

utilisées: le $\text{N}_3\text{-PEG}_4\text{-COOH}$ ou le $\text{HS-PEG}_4\text{-COOH}$. Cependant, pour PEGyler la nanoplateforme au maximum et pour des raisons pratiques au niveau de la quantification, la réaction thiol-yne a été préférée. En effet, celle-ci permet de faire réagir deux molécules présentant une fonction thiol sur une fonction alcyne contrairement à la réaction de cycloaddition où chaque fonction azide réagit avec une fonction alcyne. Ainsi, un meilleur taux de greffage est attendu pour le $\text{HS-PEG}_4\text{-COOH}$. En termes de caractérisation, la méthode OPA ne peut pas être utilisée puisqu'aucune fonction amine n'est présente. Cependant, le $\text{HS-PEG}_4\text{-COOH}$ possède un avantage majeur : la présence de l'atome Soufre. En effet, le pourcentage atomique Fer/Soufre, qui peut être déduit de l'analyse EDX, Annexe 2, permettra la quantification.

Ainsi les deux PEG hétérobifonctionnels choisis pour cette étude sont présentés Figure 15. Ils présentent une fonction amine ou thiol nécessaire au couplage sur les nanoplateformes respectivement par chimie des carbodiimides et par chimie click et une fonction acide carboxylique, qui se retrouvera donc à la surface externe de la nanoplateforme et pourra servir au couplage d'autres molécules.

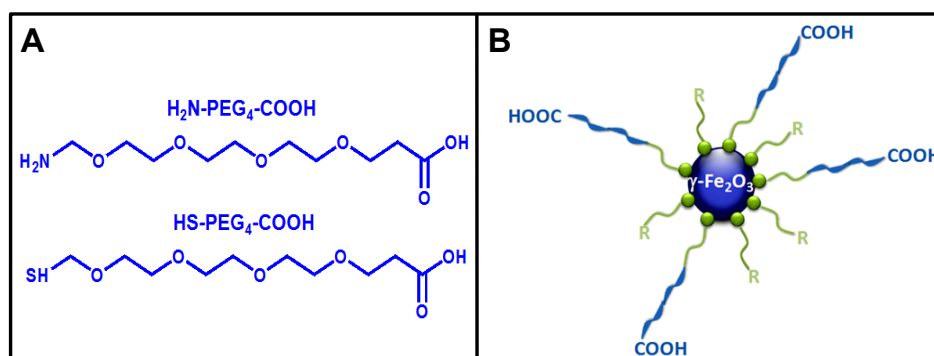


Figure 15 : Structure chimique des PEG utilisés (A) et représentation schématique de la nanoplateforme PEGylée (B)

L'efficacité du greffage, pour différents ratios R et pour différents temps de réaction dans le cas de la réaction thiol-yne, a été évaluée de manière différente selon la nanoplateforme étudiée : par dosage des fonctions amines ou par EDX. Les résultats sont récapitulés dans le Tableau 6.

	R	Temps (h)	Nbre PEG /nano	%	D _h (nm)	PdI	Zeta (mV)
Carbodiimide	2	-	50 ± 2	9 ± 1	16	0.3	-35 ± 6
	5	-	50 ± 9	9 ± 2	16	0.3	-38 ± 6
	20	-	63 ± 3	11 ± 1	18	0.3	-34 ± 7
	50	-	87 ± 13	16 ± 2	18	0.3	-38 ± 10
Click	5	0.5	204 ± 20	51 ± 5	22	0.2	-44 ± 8
	5	1.5	221 ± 22	55 ± 5	19	0.2	-40 ± 7
	5	16	144 ± 15	36 ± 4	22	0.2	-41 ± 6
	50	1.5	192 ± 20	48 ± 5	20	0.3	-43 ± 8

Tableau 6 : Détermination du nombre de PEG par la méthode OPA sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-COOH}$ ou par EDX sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH}$, tailles hydrodynamiques et potentiel de surface en fonction du ratio R et/ou du temps de réaction

Ainsi, pour un couplage par chimie des carbodiimides, les résultats montrent que le nombre de molécules greffées à la surface augmente avec le ratio R. Nous passons d'une nanoplateforme PEGylée à 9 % pour R=2 à un taux de greffage de l'ordre de 16 % pour R=50.

En ce qui concerne la chimie click, les résultats montrent que la réaction thiol-yne est une réaction plutôt rapide (taux de greffage de 51% après 30 min) et que le temps optimal de réaction se situe à 1h30 (taux de greffage de 55%). L'augmentation de la durée d'irradiation n'a pas pour effet d'augmenter le nombre de molécules par nanoparticule. En effet, après 16 h de réaction, le taux de greffage est inférieur (environ 36 %) à ceux observés à des temps plus courts. L'augmentation du ratio n'améliore pas le taux de greffage. Ainsi pour un ratio R=50 après 1h30 de réaction, on obtient une nanoplateforme PEGylée à 48 %, résultat du même ordre de grandeur que celui observé pour le ratio R=5.

D'après ces résultats, nous constatons que, pour un rapport R=5 par chimie des carbodiimides, 9 % de la nanoplateforme est PEGylée alors que ce résultat est 6 fois supérieur par chimie click (55%). Par ailleurs, même en augmentant le ratio R lors du couplage par chimie des carbodiimides, nous obtenons seulement 16% de $\text{H}_2\text{N-PEG}_4\text{-COOH}$ par nanoparticule, pour un ratio R=50, ce qui est largement inférieur aux résultats obtenus par click. Ces différences peuvent être expliquées d'une part, par la réaction thiol-yne elle-même puisque deux molécules peuvent réagir sur une seule fonction alcyne et d'autre part, à une faible activation des acides carboxyliques à la surface des nanoparticules lors de la réaction par chimie des carbodiimides.

En comparaison avec le couplage des fluorophores, on remarque que le taux de greffage est supérieur pour le PEG. En effet, pour un ratio $R=20$, on obtenait environ 7% de R123 par nanoparticule et 38 % pour $R-N_3$. Les taux de greffage plus importants lors du couplage du PEG peuvent s'expliquer par le plus faible encombrement stérique de celui-ci, allié à une meilleure réactivité de la fonction amine aliphatique (en comparaison avec l'amine aromatique dans le cas du R123) pour la chimie des carbodiimides ou à l'utilisation de la réaction thiol-yne pour la chimie click.

Les propriétés hydrodynamiques et le comportement magnétique des nanoplateformes PEGylées ont été étudiés et sont reportés Tableau 6 et Figure 16. Les tailles hydrodynamiques, les charges de surface et les intensités des signatures MIAplex restent stables quel que soit le taux de couplage.

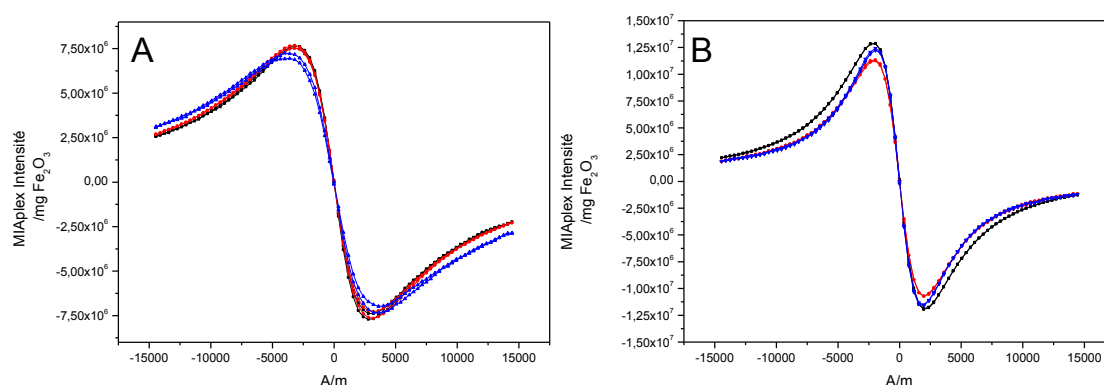


Figure 16 : Evolution de la signature MIAplex® (normalisées / mg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en fonction du rapport R (A) ($R=0$ en noir, $R=5$ en rouge et $R=50$ en bleu) sur $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@HMBP\text{-COOH}$ et (B) du temps de couplage ($R=0$ en noir, $R=5$ 30 min en rouge, $R=5$ 1h30 en bleu) sur $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@HMBP\text{-C}\equiv\text{CH}$

En conclusion, les résultats obtenus pour le couplage de chaînes PEG, montrent que la réaction thiol-yne est plus avantageuse. Elle permet d'obtenir des taux de greffage élevés, pour un temps de réaction court, et des ratios R relativement faibles.

III. 4. Couplages de peptides RGD

Nous avons dans un troisième temps comparé l'efficacité de couplage de molécules biologiques par chimie des carbodiimides ou click. Il s'agit de peptides basés sur la séquence peptidique cRGDfK, Figure 17, présentant une fonction réactive de type amine sur le résidu de la lysine, servant au couplage par chimie des carbodiimides. La fonction amine sur l'acide

aminé de la lysine a été modifiée en fonction azide pour permettre le couplage par click. Par ailleurs, des chaînes PEG ont été ajoutées entre le motif RGD et la fonction terminale (amine ou azide) afin de servir d'espaceur entre le motif RGD et la nanoplateforme.

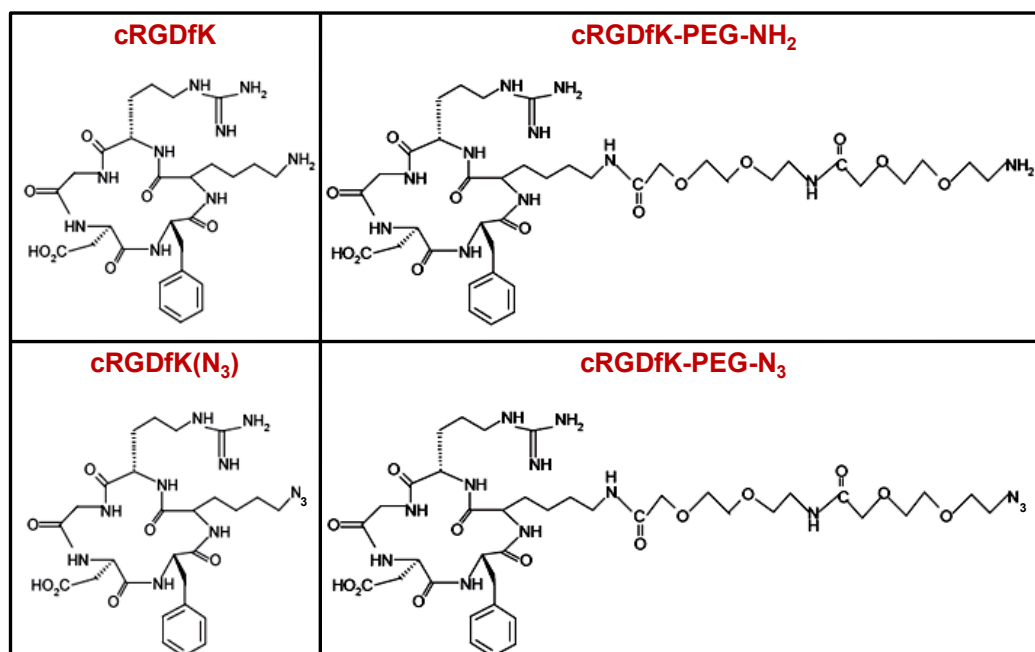


Figure 17 : Molécules présentant le motif RGD utilisées pour les couplages sur les nanoplateformes

Les différentes expériences ont été réalisées pour un ratio $R=2$, sous micro-ondes afin d'optimiser le couplage. La quantification des peptides a été réalisée par la méthode de dosage des fonctions amines à l'aide du réactif OPA. Elle peut être utilisée pour les différents types de couplages au vu des fonctions amines présentes sur les peptides. Les droites d'étalonnage réalisées sur les solutions des dérivés de cRGD libres à concentration croissante sont présentées en Annexe 3.

Les différentes nanoplateformes ainsi élaborées ont également été caractérisées par diffusion de la lumière et l'évolution des propriétés magnétiques a été étudiée par MIAplex, Figure 18. L'ensemble des résultats est regroupé dans le Tableau 7.

	RGD	Nbre / nano	%	D_h (nm)	PdI	Zeta (mV)
Carbo diimide	cRGDfK	6 ± 1	1 ± 0.2	10	0.3	-36 ± 7
	cRGDfK-PEG-NH ₂	12 ± 1	2 ± 0.2	16	0.2	-39 ± 6
Click	cRGDfK(N ₃)	36 ± 4	8 ± 1	15	0.3	-39 ± 8
	cRGDfK-PEG-N ₃	50 ± 5	11 ± 1	19	0.3	-43 ± 8

Tableau 7 : Résultats de couplages d'un motif RGD sur les différentes nanoplateformes ($R=2$)

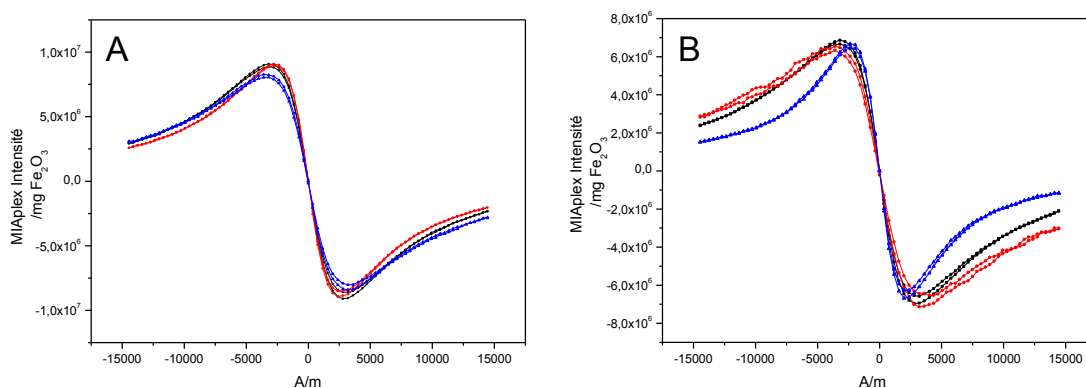


Figure 18 : Evolution des signatures MIAplex® (normalisée / mg γ -Fe₂O₃) des nanoplateformes présentant un motif RGD : (A) γ -Fe₂O₃@HMBP-COOH (en noir) couplé au peptide cRGDfK R=2 (en rouge), cRGDfK-PEG (en bleu) ; (B) γ -Fe₂O₃@HMBP-C≡CH (en noir) couplé au peptide cRGDfK R=2 (en rouge), cRGDfK-PEG (en bleu)

En ce qui concerne le couplage par chimie des carbodiimides, pour R=2, le taux de greffage du cRGDfK et du cRGDfK-PEG-NH₂ est respectivement de 1 et 2 %, Tableau 7. Comme précédemment dans le cas du greffage du fluorophore ou du PEG, l'utilisation de la chimie click permet d'obtenir de meilleurs rendements. Ainsi nous obtenons des taux de 8 et 11% respectivement pour le greffage du cRGDfK(N₃) et cRGDfK-PEG-N₃. Ces taux de couplages sont similaires à ceux obtenus par Lu *et al.*¹³ lors du couplage de peptides RGD, cependant des ratios plus élevés ont du être utilisés. Par ailleurs, nous pouvons observer que l'éloignement du peptide de la fonction réactive par l'introduction d'une chaîne PEG, a pour effet d'augmenter le nombre de molécules couplées, en accord avec les résultats obtenus par Lin *et al.*¹⁹ Ceci confirme, quelle que soit la stratégie de couplage, l'importance de l'encombrement stérique à proximité de la fonction réactive sur le taux de couplage. De plus, nous remarquons que les tailles hydrodynamiques, les charges de surface et les intensités des signatures MIAplex restent stables.

Ainsi, les résultats obtenus pour le couplage de peptides RGD, confirment que la réaction de Huisgen permet l'obtention de taux de greffage plus élevés.

III. 5. Elaboration de nanoplateformes multimodales

Afin d'élaborer les nanoplateformes multimodales, nous avons utilisé la stratégie en deux étapes, plus avantageuse d'un point de vue pratique, décrite dans le chapitre 2. Elle consiste à coupler les molécules cRGDfK-PEG (R=2) sur les nanoplateformes fluorescentes (R=2 MW).

Le nombre de molécules couplées, les taux d'extinction, les propriétés hydrodynamiques, et les images de fluorescence sont reportés dans le Tableau 8.



	Nbre cRGD- PEG	% cRGD- PEG	Imagerie de Fluorescence	Taux d'extinction Avant -Après		D _h (nm) Avant -Après		Pdl Avant -Après		Zeta (mV) Avant -Après	
Carbodi imide	11 ± 2	2 ± 0.4		4	45	13.2	23	0.3	0.3	-37 ± 6	-42 ± 10
Click	48 ± 3	11 ± 1		4	10	20	44.3	0.4	0.4	-37 ± 7	-37 ± 7

Tableau 8 : Nombre et % de cRGDfK-PEG couplés par chimie des carbodiimides ou par click, images de fluorescence, taux d'extinction et propriétés hydrodynamiques des nanoplateformes multimodales synthétisées

Nous pouvons remarquer un taux de greffage du cRGDfK-PEG identique sur les deux nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP}$ (cf Tableau 7), et sur les nanoplateformes fluorescentes, que ce soit par carbodiimide (2%) ou par click (11%), Tableau 8. Ceci montre que la présence du fluorophore n'a pas d'impact sur les taux de greffage des peptides. Par ailleurs, nous pouvons observer une augmentation du taux d'extinction après la 2^{ème} étape de fonctionnalisation, qui est beaucoup plus important lors du couplage par carbodiimide (45) que par click (10). Cette observation peut être reliée, de nouveau, à la présence du groupement espaceur sur la Rhodamine B modifiée. De plus, cette hausse du taux d'extinction est corrélée à une augmentation de la taille hydrodynamique. Le potentiel de surface quant à lui reste stable.

Les signatures MIAplex® des nanoplateformes multimodales sont présentées Figure 19. Les propriétés magnétiques, en particulier le comportement superparamagnétique est conservé. On peut cependant observer une diminution de l'intensité du signal pour les nanoplateformes multimodales, liée à une plus forte agglomération des particules.

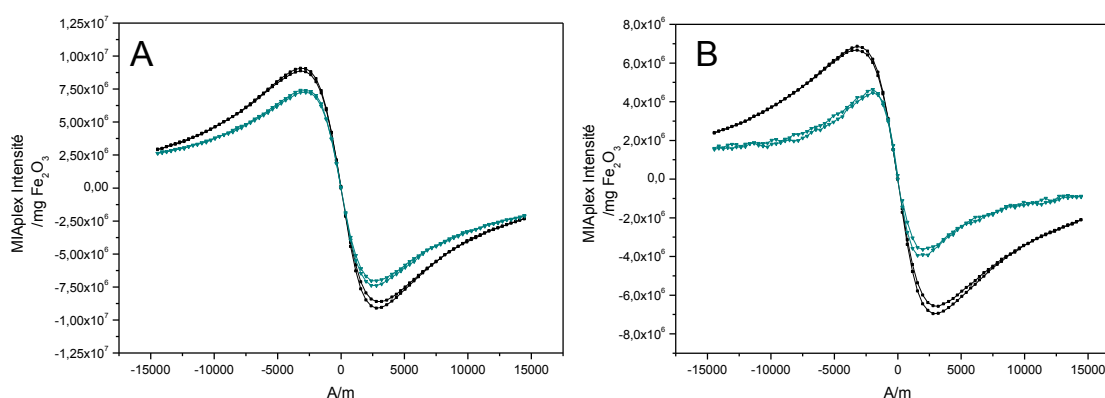


Figure 19 : Signatures MIAplex® (normalisées / mg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) des nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP}$ (noir) et multimodales (bleu) obtenues par (A) chimie des carbodiimides et (B) chimie click

IV. Comparaison de la stabilité en milieu biologique

L'évaluation de la stabilité en milieu biologique a été étudiée sur les nanoplateformes fluorescentes (R=2 MW) en les dispersant dans le sérum SVF à 10 et 50% et en suivant l'évolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps, Figure 20.

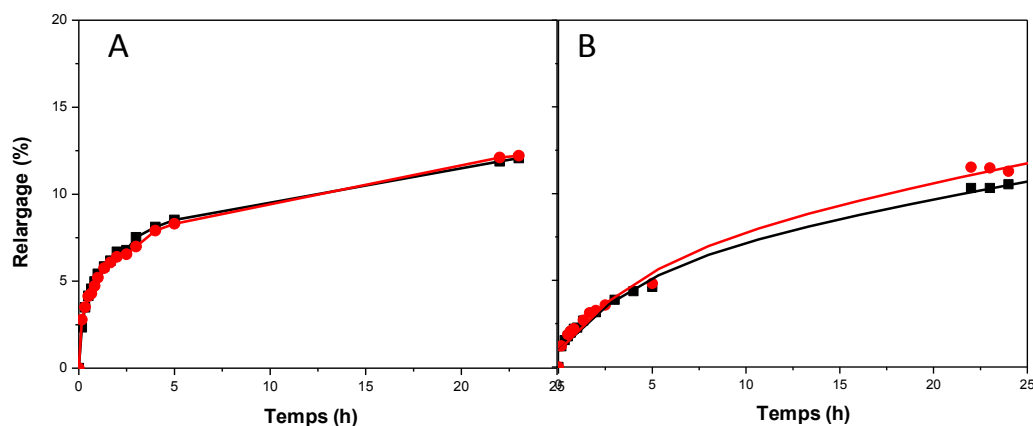


Figure 20 : Suivi de l'évolution de fluorescence (dans 10% (courbes noires) et 50 % (courbes rouges) de sérum SVF) en fonction du temps des nanoplateformes fluorescentes (R=2 sous micro onde) obtenues par (A) chimie des carbodiimides ou (B) chimie click

L'évolution de la fluorescence en fonction du temps indique un relargage inférieur à 15% après 24 h que ce soit pour les nanoplateformes obtenues par chimie des carbodiimides (13%) ou par chimie click (11%). Ceci montre que les nanoparticules sont stables en milieu biologique quelque soit la méthode de couplage étudiée. Par ailleurs, dans le chapitre 2 la question du relargage par coupure de la liaison amide ou par décrochement du complexe fluorophore-molécule complexante avait été soulevée. Les valeurs similaires obtenues sur les nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-Fluorophore}$, synthétisées par chimie des carbodiimides et chimie click, confirment l'hypothèse du relargage en faveur d'un décrochement du complexe.

V. Evaluation des nanoplateformes synthétisées en tant qu'agent de contraste IRM

Le potentiel des nanoplateformes synthétisées en tant qu'agent de contraste T2 a été évalué sur un IRM clinique 1.5T. La Figure 21 montre les valeurs de relaxivités r_2 obtenues pour les différentes nanoplateformes.

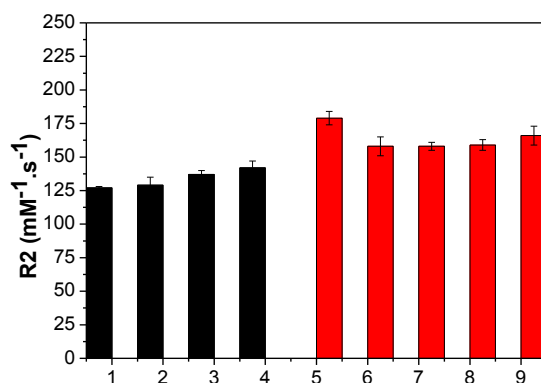


Figure 21 : Relaxivités R2 mesurées sur un IRM clinique 1.5T sur la nanoplateforme (1)) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-COOH}$ fonctionnalisée par (2) du PEG (R=50), (3) du cRGDfK-PEG (R=2) et (4) sur la nanoplateforme multimodale obtenues par chimie des carbodiimides ; sur la nanoplateforme (5) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C-C}\equiv\text{H}$ fonctionnalisée par (6) du PEG (4 unités, R=5 1h30), (9) du PEG (45 unités, R=5 1h30), (7) du cRGDfK-PEG (R=2), (8) sur la nanoplateforme multimodale obtenue par click

Nous pouvons ainsi constaté que le couplage des molécules (fluorophore, PEG ou cRGD) a peu d'influence sur la valeur de la relaxivité transversale que le couplage ait lieu par chimie des carbodiimides ou click puisque l'on obtient des valeurs r2 comprises respectivement entre 127 mM⁻¹.s⁻¹ et 142 mM⁻¹.s⁻¹ et entre 158 mM⁻¹.s⁻¹ et 179 mM⁻¹.s⁻¹.

VI. Affinité des nanoplateformes vis-à-vis des intégrines

Afin d'étudier l'affinité des nanoplateformes vis-à-vis des intégrines $\alpha_v\beta_3$, nous avons utilisé la méthode de dosage de liaisons sur support solide en présence d'un compétiteur radioactif, l'¹²⁵I-Echistatine.(cf Annexe 3)

VI. 1. Comparaison des nanoplateformes obtenues par chimie des carbodiimides et chimie click

La Figure 22 montre l'ensemble des courbes permettant la détermination des IC50 et le Tableau 9 reporte l'ensemble des résultats (IC50, K_i).

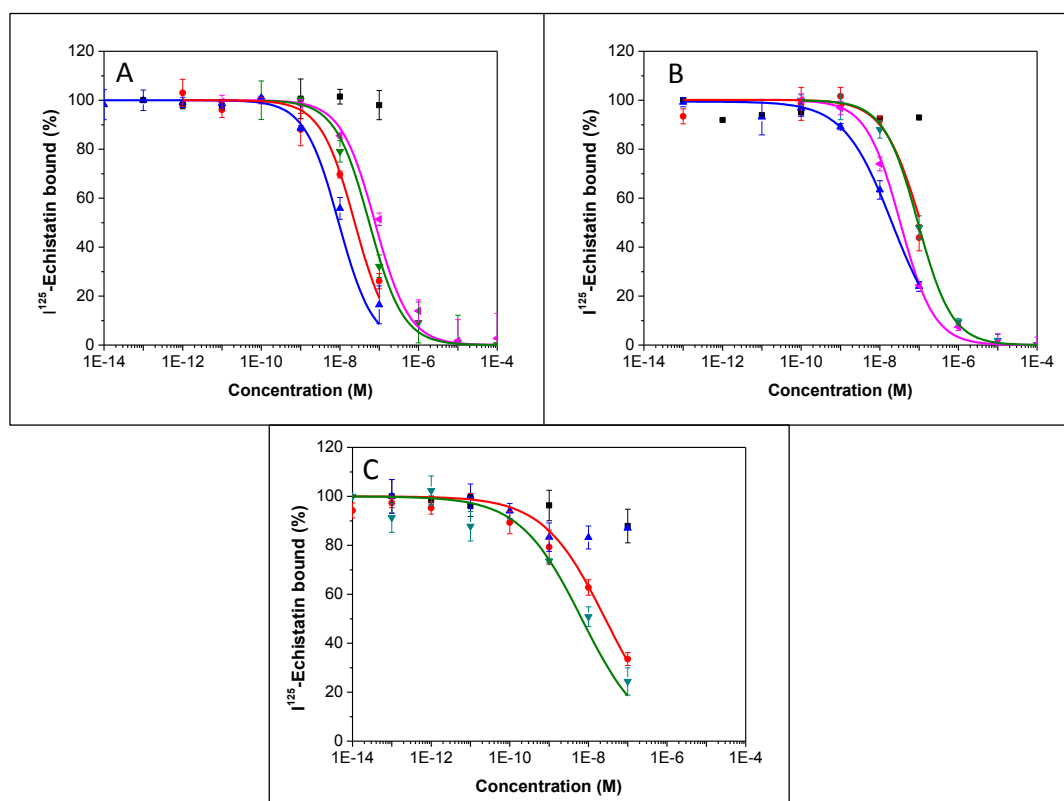


Figure 22 : Le compétiteur, ^{125}I -echistatine, a été ajouté à une concentration finale de 0.05 nM en présence de ligands compétiteurs à diverses concentrations. Après 3h de co-incubation, les puits sont lavés et la radioactivité est mesurée. Les ligands étudiés sont (A) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-COOH}$ (noir), les peptides cRGDfK (vert), cRGDfK-PEG- NH_2 (rose) et les courbes rouge et bleu correspondant à leur couplage respectif sur $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-COOH}$ par chimie des carbodiimides pour un ratio $R=2$; (B) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH}$ (noir), les peptides cRGDfK- N_3 (vert), cRGDfK-PEG- N_3 (rose) et les courbes rouge et bleu correspondant à leur couplage respectif sur $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH}$ par chimie click pour un ratio $R=2$; (C) Nanoplateformes multimodales obtenues par chimie des carbodiimides (rouge) et chimie click (vert) ainsi que leurs blancs (noir) et (bleu) respectivement

	RGD	Grafted Molecule Number	%	IC50 (nM)	K_i (nM)
Carbodiimide	cRGDfK	-	-	93	76
	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@cRGDfK}$	6 ± 1	1 ± 0.2	99	81
	cRGDfK-PEG- NH_2	-	-	32	26
	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@cRGDfK-PEG-}\text{NH}_2$	12 ± 1	2 ± 0.2	21	17
	Multimodale	11 ± 2	2 ± 0.4	27	22
Click	cRGDfK(N_3)	-	-	54	44
	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@cRGDfK}(\text{N}_3)$	36 ± 4	8 ± 1	23	19
	cRGDfK-PEG- N_3	-	-	77	63
	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@cRGDfK-PEG-}\text{N}_3$	50 ± 5	11 ± 1	10	8
	Multimodale	48 ± 3	11 ± 1	5.3	4.3

Tableau 9 : IC50 et K_i obtenus par compétition, des peptides seuls ainsi que couplés aux nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-COOH}$ et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH}$ avec un ratio $R=2$, par chimie des carbodiimides ou click

Tout d'abord, il n'est pas observé d'interactions entre les nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-COOH}$ et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH}$ et les intégrines. Les constantes d'affinité des nanoplateformes présentant un motif RGD (cRGD ou cRGD-PEG) sont améliorées par rapport au peptide seul lorsque le couplage est réalisé par chimie click alors qu'elles restent similaires dans le cas de la chimie des carbodiimides. Ces derniers résultats peuvent être liés au faible nombre de dérivés RGD couplés sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-COOH}$. Ainsi l'affinité est améliorée de 2 à 5 fois en utilisant la chimie click, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Thorek *et al*, lors du couplage d'un anticorps.²⁰ Concernant les nanoplateformes multimodales, elles ont une affinité comparable aux nanoplateformes non fluorescentes présentant un nombre similaire de RGD, indiquant que la présence du fluorophore n'a pas d'impact sur les interactions entre le peptide et l'intégrine.

Ainsi pour un même ratio, le couplage par chimie click permet d'obtenir un plus grand nombre de peptides par particule, menant à une meilleure affinité vis-à-vis des intégrines.

VI. 2. Etude de la longueur de la chaîne PEG

Dans le but d'étudier l'influence de la distance entre le motif RGD et la nanoplateforme, nous avons couplé un PEG, de type SH-PEG-COOH, de taille plus importante par réaction thiol-yne, réaction permettant d'avoir les plus hauts rendements. L'introduction de la chaîne PEG permet d'avoir des fonctions acides carboxyliques à la surface externe des nanoplateformes, Figure 15B, ce qui permet d'envisager, lors d'une seconde étape, le couplage du peptide cRGDfK par chimie des carbodiimides. Nous avons donc utilisé un PEG présentant 4 unités HS-PEG₄-COOH et un autre plus long présentant 45 unités HS-PEG₄₅-COOH. Le Tableau 10 présente les résultats obtenus. L'augmentation de la longueur de chaîne diminue le taux de greffage du PEG (de 55 à 15 %). Nous avons ainsi environ 4 fois moins de fonctions acides carboxyliques sur la nanoplateforme PEGylée avec le plus long PEG. La taille hydrodynamique et le potentiel de surface sont respectivement de 13,5 nm et de (-36 ± 12) mV, montrant une bonne stabilité. Après couplage du peptide (R=2, ratio calculé par rapport aux fonctions alcynes de départ), le taux de greffage du RGDfK est similaire (3%) sur les deux nanoplateformes. Ceci montre que l'augmentation de la distance entre la nanoplateforme et les fonctions réactives rend ainsi plus accessible les fonctions acides carboxyliques pour le couplage du peptide. Cependant, en ce qui concerne les constantes d'affinités nous pouvons observer que les valeurs obtenues sont similaires quelle que soit la longueur de chaîne. Ce

résultat est inattendu car nous pensions que le fait d'augmenter la distance entre le peptide et la nanoplateforme permettrait une meilleure accessibilité et une meilleure interaction avec les intégrines.

PEG (Nbre unités)	1 ^{ère} étape					2 ^{ème} étape						
	Nbre PEG	% PEG	D _h (nm)	PdI	Zeta (mV)	Nbre RGD	% RGD	D _h (nm)	PdI	Zeta (mV)	IC50 (nM)	K _i (nM)
4	221 ± 22	55 ± 5	19	0.2	-40 ± 7	11 ± 3	3 ± 1	19	0.2	-40 ± 7	9	7.3
45	67 ± 7	15 ± 2	13.5	0.2	-36 ± 12	14 ± 3	3 ± 1	14	0.2	-36 ± 7	5.8	4.7

Tableau 10: Etude de l'influence de la longueur de chaîne PEG – Nombre et % de PEG (HS-PEG₄-COOH ou HS-PEG₄₅-COOH) couplé par thiol-yne sur la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH}$ (R=5 1h30), Nombre et % de RGDfK couplé par chimie des carbodiimides sur les nanoplateformes PEGylées (R=2), propriétés hydrodynamiques, IC50 et constantes d'affinités

Dans ce chapitre, nous avons pu étudier deux méthodes de couplage différentes, la chimie des carbodiimides et la chimie click, pour fonctionnaliser la surface des nanoparticules et ainsi élaborer des nanoplateformes multimodales utilisables pour la double imagerie (fluorescence et IRM) et ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$. Nous avons pu remarquer que la chimie click regroupe de nombreux avantages (réaction à pH neutre en une seule étape) et permet un meilleur taux de greffage que ce soit lors de la réaction de cycloaddition de Huisgen ou lors de la réaction thiol-yne. Ces meilleurs rendements ont été obtenus sur différentes molécules, une molécule soluble dans l'eau mais présentant un encombrement stérique dû à des groupements hydrophobes (fluorophore), une molécule hydrophile (PEG) ou une molécule biologique (RGD). D'un point de vue affinité, l'amélioration du nombre de peptides par particules par chimie click mène à de meilleures affinités.

Références Bibliographiques

1. E. Guénin, E. Degache, J. Liquier, and M. Lecouvey, *Eur. J. Org. Chem.*, 2004, **14**, 2983-2987
2. E. Guénin, J. Hardouin, Y. Lalatonne, and L. Motte, *J. Nanopart. Res.*, 2012, **14**, 1–10.
3. Y. Lalatonne, C. Paris, J. M. Serfaty, P. Weinmann, M. Lecouvey, and L. Motte, *Chem. Commun.*, 2008, 2553–2555.
4. N. Lee and T. Hyeon, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2575–2589.
5. S. Tong, S. Hou, Z. Zheng, J. Zhou, and G. Bao, *Nano Lett.*, 2010, **10**, 4607–4613.
6. A. Z. Abbasi, L. Gutiérrez, L. L. del Mercato, F. Herranz, O. Chubykalo-Fesenko, S. Veintemillas-Verdaguer, W. J. Parak, M. P. Morales, J. M. González, and A. Hernando, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 6257–6264.
7. D. Portet, B. Denizot, E. Rump, J.-J. Lejeune, and P. Jallet, *J. Colloid Interface Sci.*, 2001, **238**, 37–42.
8. C. Ghobril, G. Popa, A. Parat, C. Billotey, P. Bonazza, J. Taleb, S. Begin-Colin, and D. Felder-Flesch, *Chem. Commun.*, 2013.
9. H. He and C. Gao, *Curr. Org. Chem.*, 2011, **15**, 3667–3691.
10. N. Li and W. H. Binder, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 16717–16734.
11. J.-F. Lutz and Z. Zarafshani, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2008, **60**, 958–970.
12. K. Hayashi, M. Moriya, W. Sakamoto, and T. Yogo, *Chem. Mater.*, 2009, **21**, 1318–1325.
13. J. Lu, M. Shi, and M. S. Shoichet, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **20**, 87–94.
14. L. Polito, D. Monti, E. Caneva, E. Delnevo, G. Russo, and D. Prosperi, *Chem. Commun.*, 2008, 621–623.
15. A. Schätz, M. Hager, and O. Reiser, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 2109–2115.
16. E. C. Cutler, E. Lundin, B. D. Garabato, D. Choi, and Y.-S. Shon, *Mater. Res. Bull.*, 2007, **42**, 1178–1185.
17. A. K. Tucker-Schwartz, R. A. Farrell, and R. L. Garrell, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 11026–11029.
18. P. Demay-Drouhard, E. Nehlig, J. Hardouin, L. Motte, and E. Guénin, *Chem. Eur. J.*, 2013, **19**, 8388–8392.
19. P.-C. Lin, S.-H. Ueng, S.-C. Yu, M.-D. Jan, A. K. Adak, C.-C. Yu, and C.-C. Lin, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 2131–2134.
20. D. L. Thorek, D. R. Elias, and A. Tsourkas, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2008, **8**, 221–229.

Chapitre 4

Influence de la taille, de la forme, de la méthode de synthèse sur les propriétés des nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont des agents de contraste IRM efficaces utilisés pour améliorer les différences de relaxation entre les tissus sains et pathologiques. La biodistribution et le contraste résultant sont fortement dépendants de leur voie de synthèse, de leur forme et de leur taille. Dans ce chapitre, nous nous intéressons à ces différents aspects. Tout d'abord, nous détaillerons la synthèse de nanoparticules sphériques de différentes tailles obtenues par la voie sol-gel, ainsi que celle de bâtonnets magnétiques. Ces particules sont ensuite stabilisées en surface par le même agent complexant, l'acide caféique. Après diverses caractérisations (TEM, DLS, spectroscopie infrarouge, et ATG), l'influence de la taille des nanoparticules sphériques (de 3.7 à 9 nm), de la méthode de synthèse (micelle directe (chapitre 2) ou sol-gel sur les nanoparticules sphériques de 9 nm) et de la forme des particules sur les propriétés magnétiques sont discutées. Un peptide de type RGD est ensuite couplé sur les différentes nanoparticules et l'affinité vis-à-vis des intégrines est évaluée par dosage sur support solide.

I. Synthèse des nanoparticules

I. 1. Synthèse des nanoparticules de forme sphérique par voie sol-gel

Cette synthèse a été développée en collaboration avec le Pr. N. Pinna (Humboldt-Universität, Berlin Institut de Chimie) qui a largement exploré les synthèses de nanoparticules par voie sol-gel. La synthèse des nanoparticules est réalisée en utilisant le solvant organique, l'alcool benzylique, qui agit en tant que réactif et agent contrôlant la croissance des particules. Ce composé ($T_{eb}=205^{\circ}\text{C}$) est présent naturellement dans plusieurs végétaux et aliments. C'est un produit peu toxique, utilisé comme additif alimentaire, ou conservateur pour des produits pharmaceutiques ou cosmétiques. Aisément dégradable, il peut être considéré comme ayant des effets peu prononcés sur l'environnement.¹ Il est ainsi un composé de choix dans le cadre de la synthèse de nanoparticules destinées à des applications biologiques.

Les synthèses sont réalisées par réaction de l'alcool benzylique (5 mL, 48 mmol) avec le sel précurseur $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (0.56 mmol) sous irradiation micro-ondes. L'utilisation des micro-ondes permet de réduire de façon considérable le temps de réaction (30 min contre 2 jours).¹ Le contrôle de taille des nanoparticules est obtenu en contrôlant la température pendant la

synthèse (180, 200 ou 250 °C). La suspension noire obtenue est ensuite lavée 1 fois avec de l'acétate d'éthyle, 3 fois avec de l'éthanol puis 3 fois avec de l'eau déionisée.

I. 2. Synthèse des nanoparticules de forme allongée

Afin d'étudier un éventuel effet de forme, des bâtonnets magnétiques ont été synthétisés selon la procédure décrite par Milosevic *et al.*², détaillée en Annexe 6. Brièvement, ces nanobâtonnets sont obtenus en deux étapes. Tout d'abord, des bâtonnets d'akaganéite β -FeOOH sont obtenus par hydrolyse forcée d'une solution aqueuse de FeCl_3/HCl en présence de dopamine (DOPA). La dopamine est utilisée comme poison de surface afin de contrôler la forme des particules. Les bâtonnets d'akaganéite β -FeOOH sont ensuite réduits sous irradiation micro-ondes en utilisant l'hydrazine comme agent de réduction. Il est à noter que la réduction n'est pas totale et conduit à des bâtonnets de composition hétérogène (β -FeOOH, γ -Fe₂O₃).

I. 3. Fonctionnalisation de surface

La fonctionnalisation des nanoparticules sphériques ou des bâtonnets par l'acide caféique est réalisée à pH 10, pendant 2 heures, de la même manière que dans le chapitre 2. Après plusieurs lavages à pH 2, les particules sont redispersées à pH physiologique puis caractérisées.

II. Caractérisations physico-chimiques

II. 1. Détermination de la taille par MET

La Figure 1 montre les clichés MET et les distributions en taille des nanoparticules obtenues par la voie sol-gel après complexation des molécules d'acide caféique à la surface. Les paramètres de la distribution en taille (taille et écart type) sont reportés dans le Tableau 1. Les caractéristiques obtenues pour les nanoparticules sphériques de 9 nm de diamètre obtenues par micelle directe (MD) sont également reportées pour la comparaison.

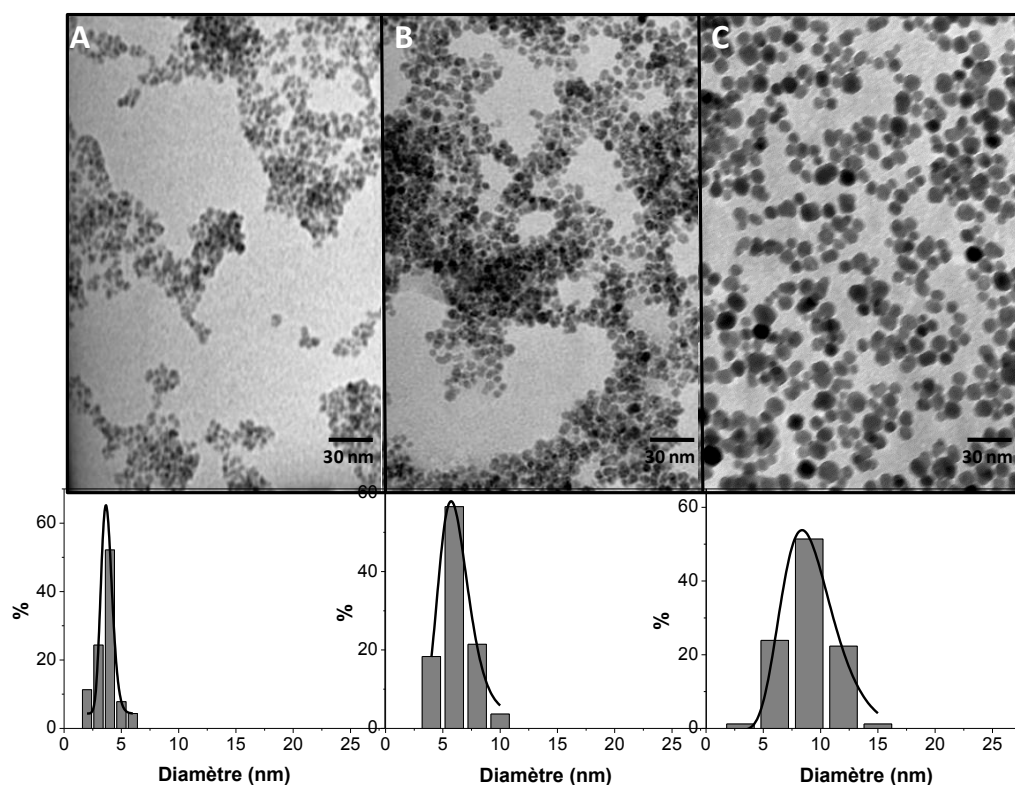


Figure 1 : Clichés MET et distribution en taille des nanoparticules obtenues par la méthode sol-gel

T° (°C)	180	200	250	MD
Diamètre (nm)	3.7	6.0	9.0	9.0
Ecart type σ	0.13	0.22	0.26	0.20
Ecart type w_0 (nm)	0.48	1.3	2.4	1.8

Tableau 1 : Diamètre et écart type des différentes nanoparticules synthétisées par la méthode sol-gel

Ainsi la synthèse par voie sol-gel permet d'obtenir des nanoparticules de forme sphériques et dont on peut contrôler la taille en changeant la température. Une relation linéaire taille-température est obtenue, Figure 2.

Ainsi, en utilisant une droite de tendance, nous pouvons prévoir à l'avance la taille approximative des futures nanoparticules synthétisées. Par cette méthode et en tenant compte des limitations du four à micro-onde, notamment au niveau de la température ($<300^{\circ}\text{C}$), une taille limite théorique de 13 nm pourrait être atteinte.

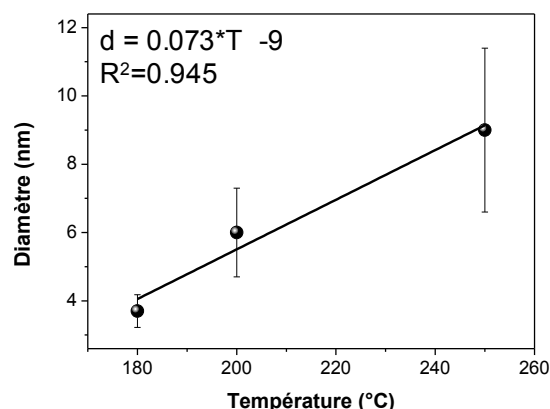


Figure 2 : Evolution du diamètre des particules en fonction de la température de synthèse

Par comparaison avec la voie micellaire directe (MD), il est à noter que pour une même taille moyenne (9 nm de diamètre), la voie sol-gel conduit à des nanoparticules présentant une distribution de taille similaire mais de forme sphérique plus homogène (cf Figure 6 Chap 2). La distribution légèrement plus étroite obtenue pour les MD, peut être liée à une plus forte agglomération des particules sur la grille, rendant impossible la détection des plus petites particules.

Enfin, la diffraction électronique (Annexe 6) indique que ces particules sont constituées de la phase maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ou magnétite (Fe_3O_4). Les structures cristallines étant très similaires, il n'est pas possible par cette technique de faire la distinction entre les deux phases.

La Figure 3 montre le cliché MET et les distributions en taille (longueur et diamètre) des bâtonnets synthétisés. Ils présentent une longueur de 42.1 nm ($\sigma=0.17$, $w_0=7.2$ nm) et un diamètre de 13.4 nm ($\sigma=0.24$, $w_0=3.3$ nm).

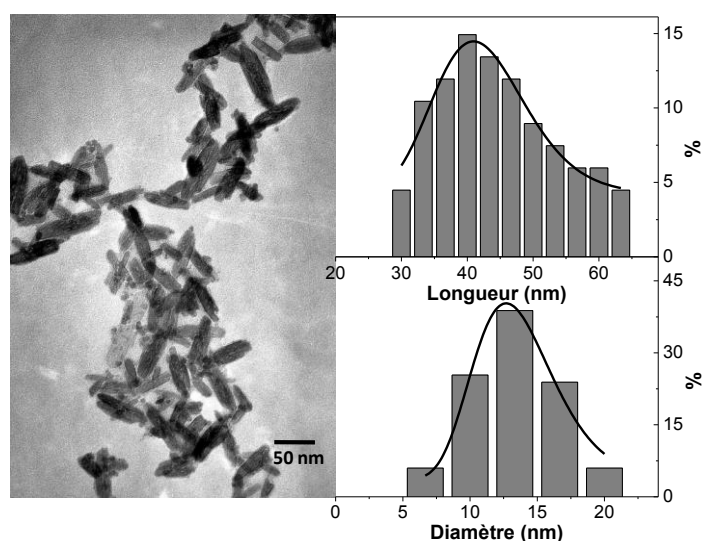


Figure 3 : Cliché MET et distribution en taille des bâtonnets

Comme précédemment décrits, ces bâtonnets sont constitués d'un mélange d'akaganeite et de maghémite.

II. 2. Propriétés hydrodynamiques

Les mesures de taille hydrodynamique et de potentiel Zeta en fonction du pH ont été effectuées en régime dilué, par diffusion dynamique de la lumière, pour chaque échantillon, Figure 4.

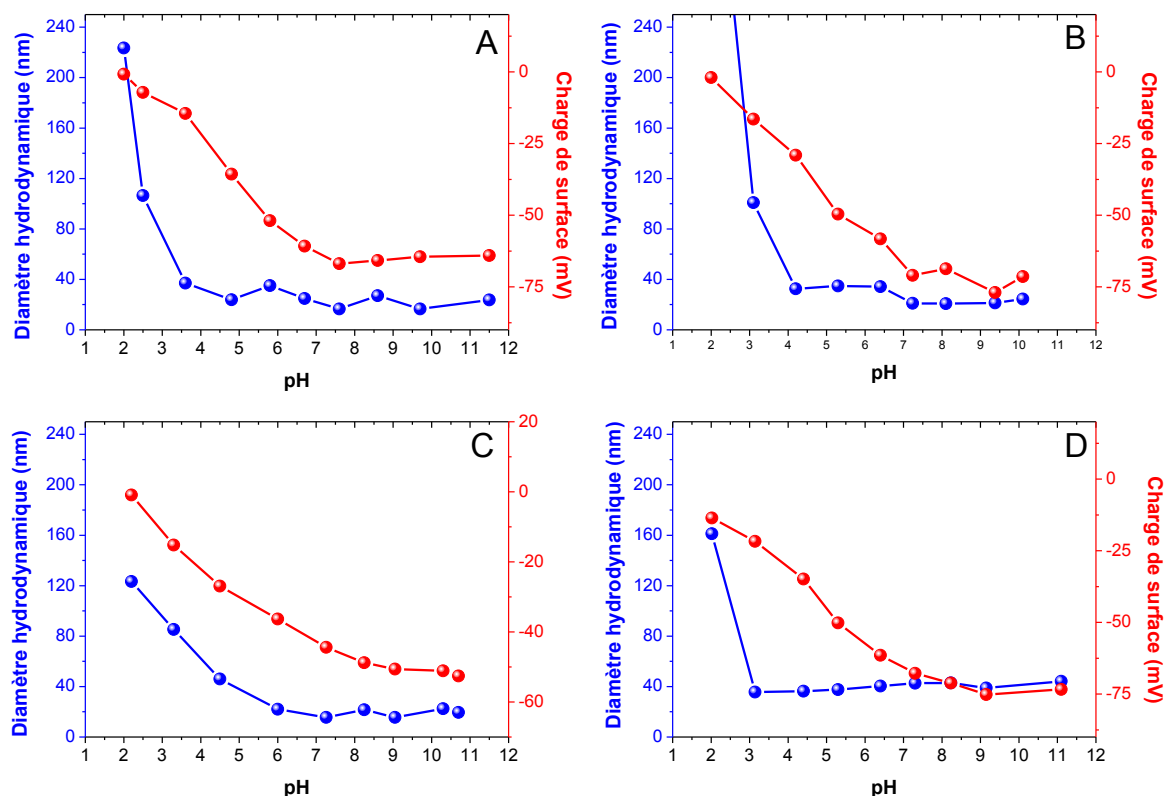


Figure 4 : Tailles hydrodynamiques et potentiel de surface en fonction du pH des nanoparticules sol gel de (A) 3.7 nm, (B) 6 nm, (C) 9 nm et (D) des nanobâtonnets

Quelle que soit la taille ou la forme des nanoparticules d'oxyde de fer, leur taille hydrodynamique augmente considérablement à pH acide, en dessous d'un pH de 4 pour les nanoparticules sphériques et d'un pH de 3 pour les nanobâtonnets. Le potentiel de surface négatif à pH basique augmente lorsque le pH diminue, jusqu'à atteindre le point isoélectrique pour un pH proche ou inférieur à 2. Ainsi ces nanoparticules sont stables sur une gamme importante de pH (de pH 3 ou 4, respectivement pour les nanobâtonnets et les nanoparticules sphériques, à pH 11). Pour rappel, un comportement similaire avait été obtenu pour les nanoparticules sphériques de 9 nm obtenues par micelle directe.

Le potentiel Zeta et la taille hydrodynamique en nombre à pH neutre de chaque échantillon sont reportés dans le Tableau 2. Les nanoparticules sphériques présentent un potentiel de surface négatif (d'environ -50 mV) montrant leur stabilité colloïdale à pH physiologique. Ces nanoparticules présentent une taille hydrodynamique supérieure à celle déterminée par MET. Cette différence est d'autant plus marquée que la taille des particules diminue. Les bâtonnets présentent une taille hydrodynamique, proche de leur longueur, et un potentiel de surface négatif de -68 mV. Il est à noter que lors de la détermination de la taille hydrodynamique par DLS, un modèle pour particules sphériques a été utilisé. Néanmoins les valeurs mesurées pour les nanobâtonnets permettent de rendre compte de la stabilité des particules.

Echantillon	Sphériques 3.7 nm	Sphériques 6 nm	Sphériques 9 nm	Sphériques 9 nm (MD)	Bâtonnets
D_h (nm)	16.6 PdI : 0.2	21.3 PdI : 0.3	21.6 PdI : 0.2	14.2 PdI : 0.2	42.7 PdI : 0.2
Zeta potentiel (mV)	-54 ± 8	-53 ± 9	-47 ± 5	-45 ± 5	-68 ± 20

Tableau 2 : Propriétés hydrodynamiques des nanoparticules sol-gel et des bâtonnets

II. 3. Etat de surface et étude qualitative de la structure cristalline par spectroscopie infrarouge

II. 3. 1. Etat de surface

La Figure 5 présente les spectres infrarouges des nanoparticules après fonctionnalisation par l'acide caféique. Sur les différents spectres des nanoparticules sphériques, on observe la présence de bandes caractéristique de la liaison Fer-Oxygène ($450-750\text{ cm}^{-1}$) et de bandes caractéristiques de l'acide caféique (entre 1200 et 1700 cm^{-1} , voir chapitre 2), permettant de confirmer la présence de cet agent à la surface des nanoparticules. Dans le cas des bâtonnets, les mêmes bandes caractéristiques de l'acide caféique sont observées, cependant un déplacement de la bande fer-oxygène, et l'apparition d'une bande prononcée entre 900 et 750 cm^{-1} , sont remarquées par rapport aux nanoparticules sphériques. Ceci doit être dû à la nature différente de la phase cristalline (présence d'akaganéite dans la structure des bâtonnets).

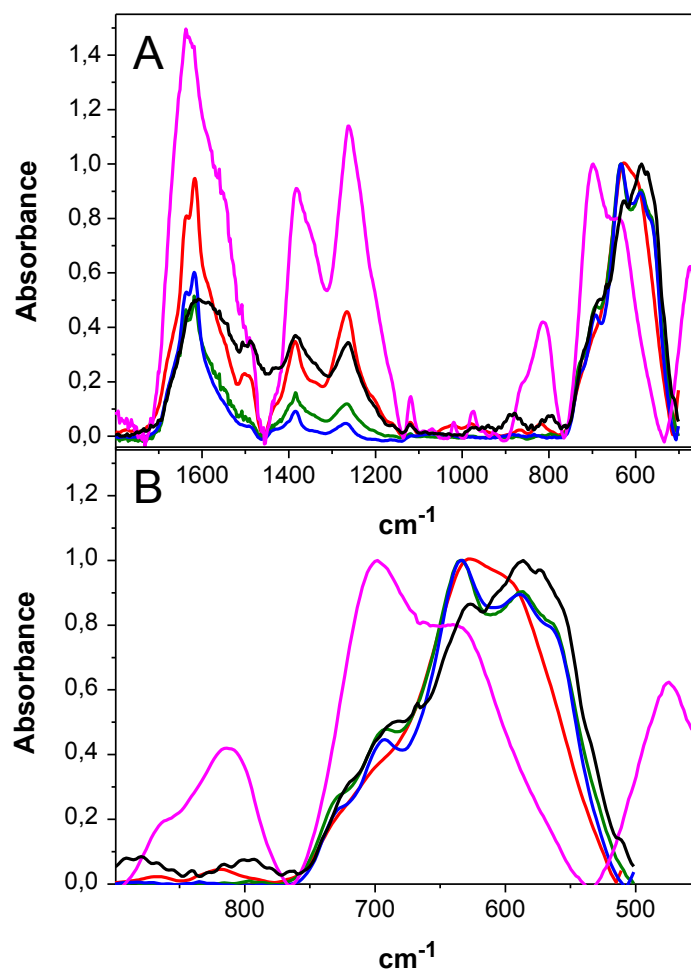


Figure 5 : (A) Spectres infrarouges des nanoparticules sphériques de 3.7 nm (courbe rouge), 6 nm (courbe verte), 9 nm (courbe bleue) obtenues par la méthode sol-gel, des nanobâtonnets (courbe rose) après fonctionnalisation par l'acide caféique, et comparaison avec les nanoparticules de 9 nm synthétisées par micelle directe (courbe noire) (B) zoom sur la partie 500-900 cm^{-1}

II. 3. 2. Interprétation qualitative de la phase cristalline

La spectroscopie infrarouge peut être utilisée pour donner une appréciation qualitative de la phase cristalline. En effet, les différentes phases cristallines (maghémite, magnétite, akaganéite, voir Annexe 1) présentent des « signatures » différentes en spectroscopie infrarouge. Une poudre constituée uniquement de magnétite Fe_3O_4 présente une bande de vibration Fe-O localisée vers 570 cm^{-1} contrairement à la maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ qui présente plusieurs bandes très proches ($500\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$) dont la résolution peut dépendre de l'ordre structural (organisation des lacunes octaédriques, présence d'impuretés).³ Ainsi dans une phase désordonnée, un élargissement des bandes d'absorption est attendu.⁴ Concernant l'akaganéite, $\beta\text{-FeOOH}$, la bande d'élongation Fe-O a été observée vers 480 cm^{-1} .⁵

Le Tableau 3 répertorie les diverses bandes caractéristiques (entre 450 et 900 cm^{-1}) des différentes nanoparticules synthétisées, obtenues par spectroscopie infrarouge, Figure 5.

	3.7 nm	6 nm	9 nm	9 nm (MD)	Bâtonnets
Bandes caractéristiques entre 450 et 900 cm^{-1}		564	564	572	475
	594	587	587	586	
	628	634	634	627	633
				667	
		693	693	685	700
		730	729	719	
					813
					864

Tableau 3 : Bandes infrarouges caractéristiques des nanoparticules synthétisées (entre 450 et 900 cm^{-1})

Concernant les nanoparticules sol-gel de 6 et 9 nm, 5 bandes, quasi identiques, sont répertoriées dans cette région. Ceci suppose une structure cristalline identique entre ces deux nanoparticules qui devrait être plus proche de la maghémite compte-tenu de la multiplicité des bandes. La nanoparticule de 3.7 nm présente un élargissement des bandes d'absorption, sans doute relié à une augmentation du désordre structural. Si l'on compare la méthode de synthèse, micelle directe ou sol-gel, sur les nanoparticules de 9 nm, on remarque un léger déplacement au niveau des différentes bandes (inférieur à 10 cm^{-1}), un changement au niveau du pic le plus intense (586 et 634 cm^{-1} respectivement) ainsi que l'apparition d'une nouvelle bande pour la synthèse par micelle directe. Des différences structurales pourraient en être la cause (proportion maghémite/magnétite, ordre structural). De la même manière que précédemment, la multiplicité des bandes, dans le cas de la synthèse par micelle directe, est en faveur d'une structure à dominante maghémite. Sur les spectres des nanobâtonnets, l'apparition d'une bande Fe-O à 475 cm^{-1} témoigne de la présence d'akaganéite. Les bandes à 813 et 864 cm^{-1} , qui ne sont pas observées sur les autres spectres, sont caractéristiques de l'akaganéite et pourraient être liés à la présence des liaisons hydrogènes O-H...Cl. Quant aux bandes à 633 et 700 cm^{-1} , elles pourraient être en accord avec la présence de maghémite et/ou être liés aux liaisons hydrogènes.⁵

Ainsi cette technique permet de donner une appréciation qualitative de la structure formée mais ne permet pas de quantifier précisément la proportion de chaque phase. D'autres techniques, comme la spectroscopie Raman peuvent être utilisées pour différencier les structures. La spectroscopie Mössbauer, quant à elle, sensible au degré d'oxydation des

atomes de fer ainsi qu'à leur environnement, permet de déterminer avec précision la déviation de stœchiométrie δ dans $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$, donnant ainsi une appréciation quantitative de la structure. Cependant nous n'avons pas eu accès à ces dernières techniques.

II. 3. 3. Quantification du nombre de ligand

Afin de quantifier le nombre d'acide caféique à la surface de ces nouvelles nanoparticules, nous avons utilisé deux méthodes : l'analyse thermogravimétrique et la spectroscopie infrarouge. La première technique consommant une quantité de produit importante a été réalisée pour les nanoparticules de 9 nm sol-gel, qui seront utilisées comme référence et pour les bâtonnets, présentant une structure cristalline très différente des nanoparticules sol-gel (Annexe 6). Par spectroscopie infrarouge, le rapport des aires de la bande de vibration caractéristique de l'acide caféique (entre $1455\text{-}1731\text{ cm}^{-1}$) et de celle du fer (entre $500\text{ et }760\text{ cm}^{-1}$) est caractéristique de la quantité de molécules d'habillage par nanoparticule. Ainsi, par ATG il est mesuré, en moyenne, 560 ± 60 molécules d'acide caféique pour les nanoparticules de 9 nm sol-gel. Ce taux de couverture est utilisé comme référence pour la quantification infrarouge. L'évolution du nombre d'acide caféique en fonction de la surface des particules est présentée Figure 6 et les résultats sont regroupés dans le Tableau 4. Une évolution linéaire est constatée, mettant ainsi en évidence un taux de couverture constant correspondant à une surface moyenne de 2.3 CA/nm^2 (pente de la droite). Ainsi, pour les nanoparticules sol-gel, la surface occupée par une molécule d'habillage est d'environ 43 \AA^2 .

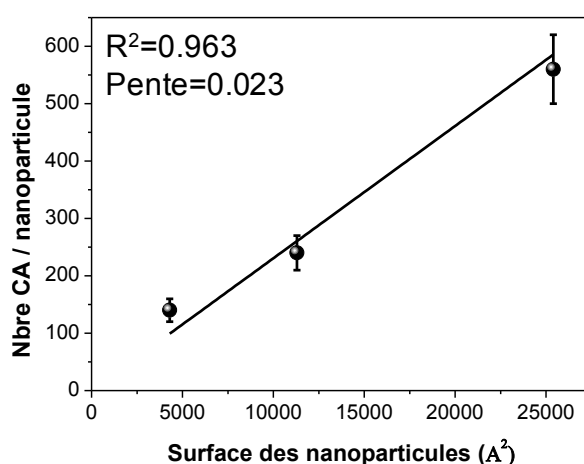


Figure 6 : Evolution du nombre d'acide caféique par nanoparticule en fonction de la surface des nanoparticules

	Nbre CA / NP	Surface des particules (Å ²)	Surface occupée par un CA (Å ²)
3.7 nm	140 ± 20	4300	36 ± 4
6 nm	240 ± 30	11300	46 ± 5
9 nm	560 ± 60 (ATG)	25400	43 ± 4
9 nm (MD)	1100 ± 100 (ATG)	25400	23 ± 2
Bâtonnets	5800 ± 300 (ATG)	205000	35 ± 2

Tableau 4 : Nombre d'acide caféique par nanoparticule et taux de couverture

Cette surface occupée par un acide caféique est environ 1.9 fois plus importante que celle mesurée pour les nanoparticules MD. Ceci indique, pour les nanoparticules issues de la voie sol-gel, une plus faible réactivité de surface et un plus faible nombre de sites actifs pour la chimisorption de l'acide caféique. Un résultat similaire a été obtenu par Pascu *et al.*⁶ Ils ont ainsi montré que les nanoparticules synthétisées par une voie sol-gel non aqueuse sous micro-onde avaient une réactivité de surface plus faible (1.2 fois) pour l'acide oléique par rapport à celles synthétisées par décomposition thermique. Cette différence a été attribuée à des configurations différentes des plans cristallographiques provenant de la voie de synthèse.

Dans le cas des bâtonnets, la surface occupée par l'acide caféique, 35 Å², est intermédiaire entre celle occupée sur les nanoparticules sol-gel et MD, et correspond à environ 2.8 CA/nm². Les différentes nanoplateformes ont ainsi été caractérisées. L'évolution des propriétés magnétiques en fonction de la taille, de la méthode de synthèse et de la forme des nanoparticules est présentée dans le paragraphe suivant.

III. Propriétés magnétiques

La taille des particules n'est pas sans conséquence sur les propriétés magnétiques.⁷ Lorsque la taille diminue, le ratio surface sur volume augmente induisant des effets de surface prononcés, tels que des spins non colinéaires, l'effet dit de spin canting, le comportement verre de spin, impactant les propriétés magnétiques de manière significative. Ainsi, l'aimantation à saturation de nanoparticules, qui correspond à l'alignement complet de tous les moments individuels dans l'échantillon, est plus faible que le matériau massif et diminue de manière plus prononcée quand la taille des particules diminue. De plus, pour une même taille, la

méthode de synthèse peut influencer leurs propriétés magnétiques. En effet, selon les conditions d'élaboration des nanoparticules, la cristallinité, l'état de surface peuvent être modifiées, conférant au nanomatériau des propriétés magnétiques et conductrices différentes.⁴ Les hypothèses d'un désordre structural dans l'ensemble du volume de la structure cristalline ou dans une couche de surface ont été avancées pour expliquer ce fait.

Ainsi, dans un premier temps, nous étudierons l'influence des différents paramètres (taille, forme, méthode de synthèse) sur les propriétés magnétiques à l'aide d'un magnétomètre, puis nous évaluerons, dans un second temps, l'impact sur l'amélioration du contraste IRM.

III. 1. Courbes d'aimantation et ZFC-FC

La Figure 7 montre les courbes d'aimantation à température ambiante enregistrées à l'aide d'un magnétomètre (VSM) pour les différentes nanoparticules sous forme de poudre ou de suspension liquide. Le Tableau 5 récapitule les valeurs d'aimantation à saturation.

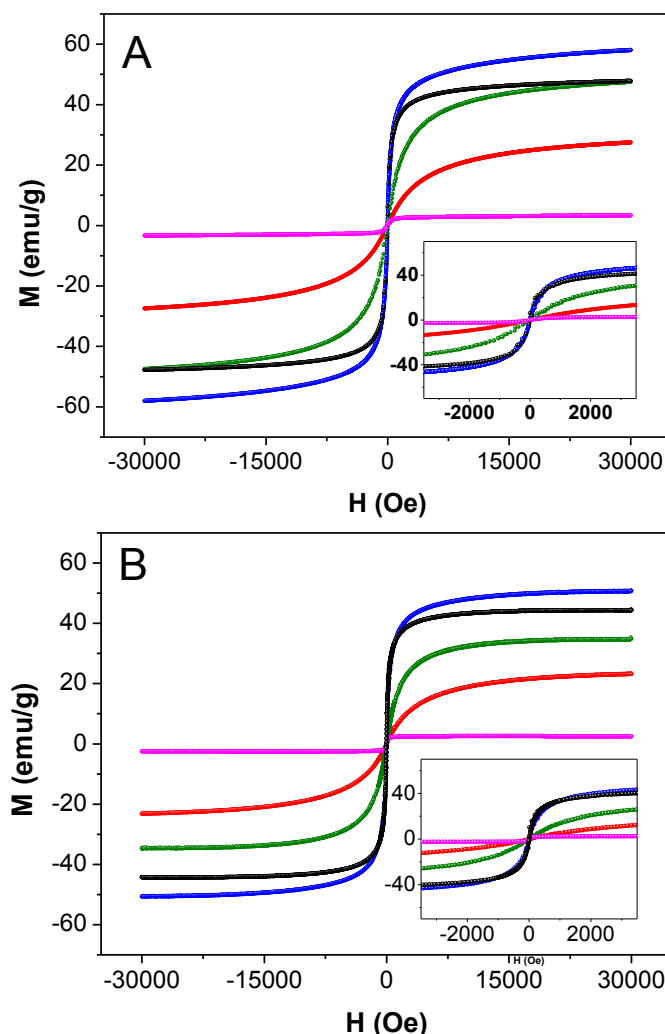


Figure 7 : Courbes d'aimantation à 300K sous forme de (A) poudre ou (B) de suspensions liquides ($c_{Fe}=20mM$) des nanoparticules sphériques de 3.7 nm (courbe rouge), 6 nm (courbe verte), 9 nm (courbe bleue) obtenues par la méthode sol-gel, des nanobâtonnets (courbe rose) après fonctionnalisation par l'acide caféique, et comparaison avec les nanoparticules de 9 nm synthétisées par micelle directe (courbe noire)

Dans tous les cas, quelle que soit la taille, la forme, la méthode de synthèse et indépendamment du conditionnement (poudre-suspension liquide), les courbes d'aimantations ne présentent pas d'ouverture de cycle, ce qui rend compte à température ambiante d'un comportement superparamagnétique.

Concernant les particules sphériques, on remarque que lorsque la taille des particules obtenues par voie sol-gel augmente, l'aimantation approche de la saturation plus rapidement tout en restant inférieure à celle du matériau massif (80 emu.g^{-1} pour la maghémite).⁸ De plus, les nanoparticules de 9 nm synthétisées par voie sol-gel montrent une aimantation à saturation supérieure, en comparaison avec celles obtenues par micelle directe, ce qui pourrait être lié à la structure cristalline (pourcentage magnétique/maghémite). Par ailleurs, les valeurs M_{sat} mesurées dans le cas des suspensions liquides sont légèrement inférieures par rapport aux

poudres, Tableau 5. Un comportement similaire a déjà été observé au laboratoire dans le cas de nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par un bisphosphonate, synthétisées par micelle directe, et de taille comprise entre 7 et 21 nm.⁹ Cette différence d'évolution de M_{sat} avec la taille en fonction du conditionnement (liquide ou poudre) peut être interprétée en tenant compte des interactions magnétiques dipolaires inter-particules, qui sont plus faibles dans le cas des suspensions diluées que dans le cas des poudres.¹⁰ De plus, les interactions dipolaires augmentent avec la taille de la nanoparticule, à même dilution. Une autre explication de la différence liquides-poudres est la relaxation brownienne. Celle-ci est nulle dans le cas des poudres, tandis qu'elle entre en compétition avec la relaxation magnétique dite « de Néel » des nanoparticules dans le cas des suspensions liquides.¹¹

La diminution de l'aimantation à saturation par rapport au matériau massif est largement décrite dans la littérature^{8,12} et est attribuée à un effet dit de « spin canting ». ¹³ Ce terme rend compte d'une couche de surface des nanoparticules magnétiquement frustrée et désordonnée. Il est à noter qu'aujourd'hui le problème du spin canting reste posé : plusieurs configurations des spins de surface sont proposées dans la littérature^{14,15}; la question du lien entre le spin canting et le désordre cristallin demeure ainsi que celle de la transition entre la phase ordonnée du cœur de la nanoparticule et celle désordonnée de la surface. Nous n'avons pas réalisé d'étude approfondie de cet effet sur nos échantillons. Nous avons choisi l'approximation d'une structure cœur-coquille où la coquille est une couche morte d'épaisseur e et d'aimantation nulle, dans laquelle les spins sont orientés aléatoirement, Figure 8.

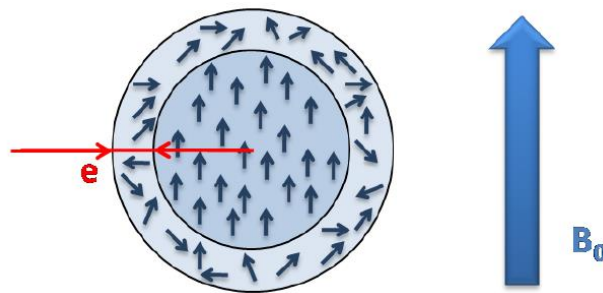


Figure 8 : Illustration de l'organisation des spins magnétiques où les spins de surface sont orientés de manière désordonnée en présence d'un champ magnétique B_0

Ainsi dans le cas des sphères, l'épaisseur e peut être déduite de l'équation 2 :¹⁶

$$M_{sat} = M_{bulk} \cdot \left(\frac{d - 2e}{d} \right)^3 \quad (2)$$

Avec M_{sat} la valeur de l'aimantation à saturation, M_{bulk} la valeur de l'aimantation du matériau massif (80 emu/g pour la maghémite), d le diamètre de la particule et e l'épaisseur de la couche de spins désordonnés.

En considérant en première approximation que les nanoparticules sont constituées uniquement de la phase maghémite, l'épaisseur e due au spin canting, la taille magnétique associée égale à $d_{\text{MET}} - 2e$, le % des spins désordonnés se trouvant dans la coquille d'épaisseur e sont reportés dans le Tableau 5 pour les deux conditionnements.

		3.7 nm	6 nm	9 nm	9 nm (MD)
Poudre	M_{sat} (emu/g)	27	47	58	48
	e (nm)	0.56	0.49	0.46	0.7
	$D_{\text{magnétique}}$ (nm)	2.6	5.0	8.1	7.6
	% spins canting	66	41	28	40
	Moment (* μ_B)	400	3000	12500	10300
	E_{dd}/k_B (K)	0.62	12	78	53
Liquide	M_{sat} (emu/g)	23	35	51	44
	e (nm)	0.63	0.72	0.63	0.81
	$D_{\text{magnétique}}$ (nm)	2.4	4.6	7.7	7.4
	% spins canting	71	56	36	45
	Moment (* μ_B)	340	2200	10900	9500
	E_{dd}/k_B (K)	0.45	6.5	60	45

Tableau 5 : Aimantation à saturation, épaisseur de la couche de spin canting, diamètre magnétique, pourcentage de spins désordonnés, moment magnétique, et forces d'interactions pour les différentes nanoparticules sphériques

Pour les différentes particules, l'épaisseur obtenue (entre 0.46 et 0.81) est en accord avec l'épaisseur de la surface de spin canting de la maghémite, qui est de l'ordre de 0.5-0.9 nm.¹⁷ Pour une même taille, on peut noter une diminution de cette épaisseur lorsque la mesure est réalisée sur l'échantillon sous forme de poudre. De plus, le pourcentage de spins désordonnés dans la nanoparticule est plus important lorsque la taille de celle-ci diminue. Ainsi 28 % des spins sont désordonnés pour une nanoparticule de 9 nm sol-gel sous forme de poudre alors

que 66% le sont lorsque la nanoparticule a une taille de 3.7 nm. Ces résultats sont donc en accord avec la diminution de l'aimantation à saturation.

Par ailleurs, la valeur de l'aimantation à saturation permet de déduire le moment magnétique de la particule, à partir de la relation 3: ¹⁷

$$m = M_{sat} \cdot \rho \cdot V \quad (3)$$

Avec m le moment magnétique, M_{sat} l'aimantation à saturation, ρ la masse volumique et V le volume de la particule

Les valeurs calculées sont reportées dans le Tableau 5 et sont exprimées en fonction de la constante μ_B , correspondant au magnéton de Bohr ($\mu_B = 9.27.10^{-24}$ A.m²). A température ambiante, le moment magnétique diminue de manière importante quand la taille de la particule diminue, pouvant être attribué d'une part au plus petit volume considéré et d'autre part à l'effet canting de spin.

La force des interactions dipolaires entre deux sphères peut être estimée, à partir des données précédentes, selon l'équation 4: ¹⁸

$$\frac{E_{dd}}{k_B} = \frac{\mu_0}{4\pi k_B} \cdot \frac{m^2}{D^3} \quad (4)$$

avec μ_0 la perméabilité du vide ($\mu_0 = 4\pi.10^{-7}$ kg.m.A⁻².s⁻²), m le moment de la particule et D la distance centre à centre entre les particules, en considérant 1.7 nm pour une double couche d'acide caféique.¹⁹

Les résultats sont regroupés dans le Tableau 5 et montrent une augmentation des interactions lorsque la taille de la particule augmente en accord avec la littérature.²⁰ Ces interactions sont diminuées pour une même taille de particules lorsque la mesure est effectuée en suspension liquide.

La Figure 9 présente les courbes ZFC-FC des différents échantillons et les températures de blocage déduites des maxima des courbes ZFC sont reportées dans le Tableau 6.

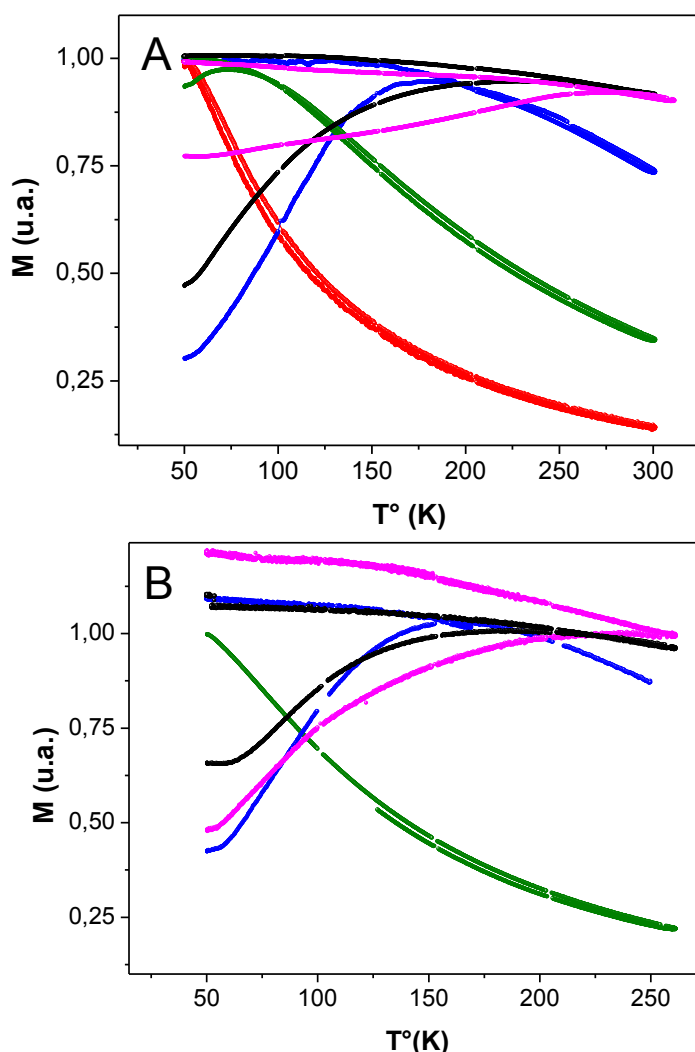


Figure 9 : Courbes ZFC-FC à 100 Oe (C) sous forme de poudre ou (D) de suspensions liquides ($c_{Fe}=20\text{mM}$) des nanoparticules sphériques de 3.7 nm (courbe rouge), 6 nm (courbe verte), 9 nm (courbe bleue) obtenues par la méthode sol-gel, des nanobâtonnets (courbe rose) après fonctionnalisation par l'acide caféique, et comparaison avec les nanoparticules de 9 nm synthétisées par micelle directe (courbe noire)

De la même manière que les courbes d'aimantation, les courbes ZFC-FC sont représentatives de différences liées à la taille des particules. Une augmentation de la température de blocage est observée lorsque la taille des particules augmente, en accord avec la littérature.^{18,17,20} A hautes températures les courbes ZFC et FC coïncident, cependant lorsque la température diminue, les courbes commencent à diverger à partir d'une certaine température, et se séparent. La courbe FC augmente lorsque la température diminue, de manière plutôt faible, cet aplanissement est relié à la présence d'interactions dipolaires entre particules.²¹ Les courbes ZFC, réalisées en suspension liquide, Figure 9B, montrent que la température de blocage diminue, ce qui est en accord avec une diminution des interactions dipolaires. En effet, dans la poudre, les particules sont plus proches les unes des autres et les interactions dipolaires modifient davantage leur comportement individuel. Ces interactions mènent au

couplage des moments magnétiques lorsque la température décroît. Ceci ralentit la relaxation thermique et empêche l'alignement des moments dans le faible champ externe. Ces effets sont amplifiés pour les plus grosses particules.²¹

	3.7 nm	6 nm	9 nm	9 nm (MD)
T_b (K) poudre	<50	75	180	230
T_b (K) liquide	-	<50	160	185

Tableau 6 : Températures de blocage des nanoparticules sphériques

La détermination de la température de blocage permet une estimation de la barrière énergétique moyenne en utilisant la formule classique, dérivée de la loi de Néel: ¹⁸

$$E_B = \ln\left(\frac{t_0}{\tau_0}\right) \cdot k_B \cdot T_B \quad (5)$$

avec k_B constante de Boltzmann ($k_B = 1.38 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$), t_0 environ égal à 1s et τ_0 égal à 10^{-9} s

Lorsque les interactions entre les nanoparticules sont négligeables, cette barrière énergétique provient seulement de l'anisotropie magnétique, et l'équation devient : ²⁰

$$K \cdot V \approx 25 \cdot k_B \cdot T_B \quad (6)$$

avec K la densité énergétique d'anisotropie magnétocristalline et V le volume des particules. La valeur moyenne de l'anisotropie magnétique, K , a été calculée à partir de l'équation (5), pour les suspensions liquides, où les interactions dipolaires sont les plus faibles. Les valeurs calculées sont respectivement de 14 et de $17 \cdot 10^5 \text{ erg} \cdot \text{cm}^{-3}$ pour les nanoparticules de 9 nm de diamètre obtenues par voie sol-gel ou MD. Elles sont 3 à 4 fois plus élevées que celles du matériau brut ($4.7 \cdot 10^5 \text{ erg} \cdot \text{cm}^{-3}$ pour la maghémite).¹⁸ La constante K est légèrement supérieure pour les nanoparticules synthétisées par micelle directe, liée à une température de blocage plus élevée. Dans les deux cas, la présence d'interactions entre particules non négligeable est mise en évidence, et entraîne par conséquent une surestimation de la constante K . Ceci est en accord avec les observations de Park *et al.*,²⁰ qui ont estimé par cette méthode de calcul une constante d'anisotropie élevée, du même ordre de grandeur (environ $10 \text{ erg} \cdot \text{cm}^{-3}$) pour des nanoparticules de 9 nm de diamètre, et ont attribué ce résultat aux fortes interactions dipolaires entre les nanoparticules.

Ces résultats donnent une première approximation de la force des interactions dipolaires et de la constante d'anisotropie, permettant ainsi une étude comparative entre les différents échantillons. Cependant, afin d'obtenir des valeurs exactes, il serait nécessaire de « simuler »

les différentes courbes obtenues (aimantation, ZFC/FC) en tenant compte de ces interactions.^{21,22}

En ce qui concerne les bâtonnets, ceux-ci présentent une valeur d'aimantation à saturation très faible, de 3 et de 2.7 emu/g, respectivement sous forme de poudre et de liquide. Cette faible aimantation doit être liée à la présence de l'akaganéite dans la structure cristallographique ainsi qu'à l'apparition d'une anisotropie de forme. Il est à noter que cette valeur d'aimantation à saturation est inférieure à celle déjà obtenue au laboratoire lors d'une précédente étude.² Ceci est lié au changement de l'appareil micro-onde au sein du laboratoire. Une étude est actuellement en cours pour optimiser ce protocole et augmenter la proportion en maghémite. La courbe ZFC révèle une température de blocage de l'ordre de 280 K et 250 K, respectivement sous forme de poudre et de liquide. Cette température est plus élevée que précédemment, sans doute reliée à une taille plus importante et/ou une importante polydispersité. La courbe FC montre un aplanissement moins marqué lorsque la mesure est effectuée en suspension liquide, montrant ainsi une diminution des interactions dipolaires.

III. 2. Etude IRM

L'efficacité d'un agent de contraste peut être décrit par sa relaxivité longitudinale (r_1) ou transversale (r_2). Ces dernières dépendent non seulement des propriétés magnétiques du matériau (composition, structure cristalline, taille, forme), mais également de la force du champ appliqué, de la température et du milieu considéré.⁷ Les nanoparticules d'oxyde de fer sont principalement décrites en tant qu'agent de contraste T2. Le contraste T2 est intéressant pour sa forte sensibilité, cependant les agents de contraste T2 produisent des signaux intrinsèques foncés qui peuvent être parfois confondus avec d'autres zones hypointenses (saignement, calcification, dépôt de métal) rendant les diagnostics plus difficiles. De plus, le fort champ magnétique généré perturbe les processus de relaxation T1.²³ Ainsi pour surmonter ces lacunes, des agents de contraste superparamagnétiques au moment magnétique faible ont été synthétisés et ont montré leur potentiel en tant qu'agent de contraste T1. Il s'agit notamment de nanoparticules d'oxyde de fer sphérique de taille inférieure à 4 nm.¹⁷ Le ratio r_2/r_1 a été utilisé pour rendre compte de l'effet de l'agent de contraste. Plus celui est élevé, plus l'effet T2 domine. A l'inverse, lorsque les relaxivités r_1 et r_2 sont du même ordre de grandeur, étant donné que les temps de relaxation T1 des tissus sont beaucoup plus élevés que les temps de relaxation T2 (de l'ordre de 10 fois), l'effet T1 est prépondérant sur l'effet T2.

Ainsi les relaxivités r_1 et r_2 des différentes nanoparticules en solution aqueuse ont été évaluées en utilisant un IRM clinique 1.5T, à température ambiante. Le Tableau 7 résume les résultats obtenus.

	r_1 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	r_2 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	r_2/r_1
3.7 nm	6.3 ± 0.4	35 ± 1	5.6
6 nm	12 ± 4	175 ± 6	15
9 nm	12 ± 1	233 ± 16	20
9 nm (MD)	7 ± 2	190 ± 6	26
Bâtonnets	0.48 ± 0.04	24 ± 2	51

Tableau 7 : Relaxivités r_1 et r_2 , et ratio r_2/r_1 obtenus pour les différentes nanoplateformes à température ambiante, dans l'eau, sur un IRM clinique 1.5T

En augmentant la taille des particules, la relaxivité r_2 augmente considérablement alors que la relaxivité r_1 est peu modifiée. Ceci entraîne une augmentation du ratio r_2/r_1 , atteignant 20 pour les nanoparticules sol-gel de 9 nm, montrant leur potentiel en tant qu'agent de contraste T2. Les nanoparticules de 3.7 nm présentent un ratio beaucoup plus faible, de 5.6, qui révèle une possible utilisation en tant qu'agent de contraste T1.

Les nanoparticules de 9 nm obtenues par micelle directe, présente une relaxivité r_2 inférieure aux nanoparticules sol-gel de même taille, concordant avec leurs propriétés magnétiques (aimantation à saturation plus faible, épaisseur de spin canting plus élevée).

Les bâtonnets, quant à eux, présentent le plus fort ratio r_2/r_1 . Ainsi leur utilisation en tant qu'agent de contraste T2 est à envisager.

IV. Couplage motif RGD

Le peptide cRGDfK-PEG-NH₂ a ensuite été couplé sur les différentes nanoplateformes par chimie des carbodiimides (voir chapitre 1 et 2). Lors des couplages, le rapport molaire peptide sur fer a été maintenu constant et égal à une valeur de 0.14. Ce rapport est identique à celui utilisé lors du couplage du cRGDfK-PEG-NH₂ (pour un rapport R=2) sur les nanoparticules de 9 nm synthétisées par voie micellaire directe (voir chapitre 2). Ainsi, nous pourrions comparer les rendements obtenus en fonction de la voie de synthèse choisie pour les nanoparticules de 9 nm. Dans les conditions opératoires choisies, le rapport entre le nombre

de fonctions réactives NH₂ du peptide et le nombre de fonctions COOH de l'acide caféique présente sur la nanoplateforme augmente avec la taille des nanoparticules (1.4, 2.7 et 3.8, respectivement pour les nanoparticules sol gel de 3.7, 6 et 9 nm et de 5.6 pour les bâtonnets). Ainsi un plus grand nombre de peptides couplés est attendu lorsque la taille augmente. La quantification a été réalisée à l'aide du réactif OPA. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 8.

	Nbre RGD /nano	% RGD /nbre CA	Nbre RGD /nm ²	D _h (nm) Avant - Après		Zeta (mV)
3.7 nm	3.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1	0.08	16.6 PdI : 0.2	20 PdI : 0.2	-41 ± 10
6 nm	10 ± 1	4.2 ± 0.4	0.09	21 PdI : 0.3	24 PdI : 0.3	-52 ± 7
9 nm	37 ± 1	6.6 ± 0.2	0.15	21.6 PdI : 0.2	27 PdI : 0.3	-42 ± 9
9 nm (MD)	61 ± 3	5.5 ± 0.3	0.23	14.2 PdI : 0.2	18 PdI : 0.2	-39 ± 7
Bâtonnets	570 ± 20	9.8 ± 0.3	0.28	42.7 PdI : 0.2	68 PdI : 0.8	-43 ± 4

Tableau 8 : Quantification du nombre de RGD par nanoparticule et propriétés hydrodynamiques des nanoparticules fonctionnalisées

Comme attendu, le nombre de peptides couplés augmente avec la taille des particules. Si l'on compare les nanoparticules de 9 nm, un plus grand nombre de peptides par nanoparticule est obtenu pour la synthèse par micelle directe, ce qui est en accord avec un plus grand nombre d'acides caféiques, et donc de fonctions réactives présentent à la surface. Le rendement de la réaction (c'est-à-dire le pourcentage de peptide par rapport au nombre initial d'acides caféiques) est à peu près similaire dans les deux cas (environ 6 %), ce qui met en évidence l'importance de la fonctionnalisation de surface (en particulier le nombre de ligands) afin d'optimiser les quantités de peptides utilisées. De plus, après couplage du peptide, nous pouvons remarquer une augmentation de la taille hydrodynamique pour les différentes nanoparticules, le potentiel de surface, quant à lui, reste négatif et relativement stable, aux incertitudes près. Cette augmentation est d'autant plus marquée sur les bâtonnets présentant le nombre le plus important de peptides couplés par particule.

L'affinité vis-à-vis des intégrines $\alpha_v\beta_3$ a ensuite été évaluée par dosage sur support solide en présence du compétiteur radioactif, l'¹²⁵I-Echistatine (voir chapitre 2). La Figure 10A montre les courbes obtenues pour les différents ligands concurrents étudiés, et le Tableau 9 récapitule les valeurs d'IC₅₀, de K_i et de facteurs β obtenues. Les valeurs des constantes d'affinité des

nanoparticules multivalentes sont plus petites en comparaison du ligand libre correspondant, excepté pour la nanoplateforme de 3.7 nm, dû à un trop faible nombre de peptides couplés. Elles sont améliorées lorsque le nombre de peptides par nanoparticule augmente. Ainsi pour les bâtonnets, une constante d'affinité inférieure au nanomolaire est calculée. Le facteur d'amélioration β varie de 0.3 à 93 et augmente linéairement en fonction du nombre de cRGD couplé, Figure 10B. Parmi ces nanoparticules sphériques, les nanoparticules de 9 nm obtenues par micelle directe présentent la meilleure affinité vis-à-vis des intégrines.

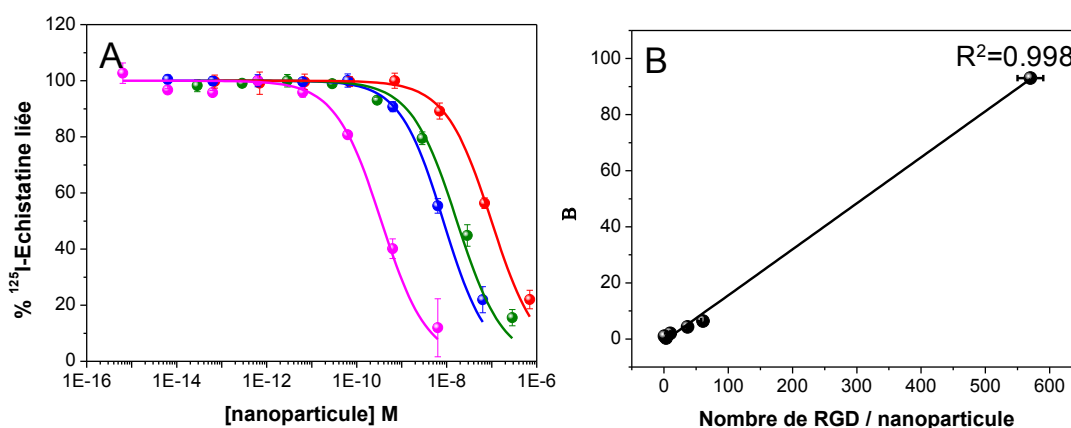


Figure 10 : (A) ¹²⁵I-echistatine a été ajoutée à une concentration finale de 0.05 nM en présence de nombreux ligands compétiteurs. Après 3h, les puits sont lavés et la radioactivité est mesurée. Les ligands étudiés sont les nanoparticules sol-gel de 3.7 nm (rouge), 6 nm (vert), 9 nm (bleu) et les bâtonnets (rose) (B) Evolution du facteur β en fonction du nombre de cRGD-PEG-NH₂

	Nbre RGD /nano	IC50	K _i	β
cRGDfK-PEG-NH₂	-	32	26	-
3.7 nm	3.5 ± 0.1	99	81	0.3
6 nm	10 ± 1	16	13	2
9 nm	37 ± 1	7	6	4.3
9 nm (MD)	61 ± 3	5	4	6.4
Bâtonnets	570 ± 20	0.34	0.28	93

Tableau 9 : IC50, K_i et facteur β obtenus par dosage par compétition des nanoplateformes sol-gel de 3.7 nm (rouge), 6 nm (vert), 9 nm (bleu), des nanoparticules de 9 nm obtenues par micelle directe et les bâtonnets (rose)

Dans ce chapitre, des nanoparticules d'oxyde de fer de différentes tailles (3.7, 6 et 9 nm) ont été synthétisées par voie sol gel, sous micro-onde, en modifiant la température de

réaction. Les propriétés magnétiques ont été examinées en fonction de la taille des particules. Une diminution de l'aimantation à saturation, de la relaxivité r_2 a été constatée en diminuant la taille des particules. Les nanoparticules de 3.7 nm ont montré un potentiel en tant qu'agent de contraste T_1 alors que les nanoparticules de 9 nm présentent un potentiel T_2 . La dépendance de la méthode de synthèse a été discutée sur les nanoparticules de 9 nm obtenues par voie micellaire directe ou sol gel et a montré une influence sur les propriétés de surface, et magnétiques (aimantation à saturation, relaxivités). L'effet de forme a été étudié sur des nanobâtonnets. Ils ont montré une faible aimantation à saturation à température ambiante et un important ratio r_2/r_1 . Un peptide cyclique PEG-RGD a ensuite été couplé par chimie des carbodiimides et l'affinité vis-à-vis des intégrines a été évaluée. Parmi les nanoparticules sphériques, les nanoparticules de 9 nm obtenues par micelle directe montrent la meilleure affinité vis-à-vis des intégrines. D'un point de vue hydrodynamique, elles présentent un état d'agrégation plus faible. De plus, leur ratio r_2/r_1 est le plus élevé. Pour ces différentes raisons, ce sont ces nanoparticules qui ont été évaluées *in vitro* et *in vivo*.

Références Bibliographiques

1. N. Pinna, S. Grancharov, P. Beato, P. Bonville, M. Antonietti, and M. Niederberger, *Chem. Mater.*, 2005, **17**, 3044–3049.
2. I. Milosevic, H. Jouni, C. David, F. Warmont, D. Bonnin, and L. Motte, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 18999–19004.
3. T. J. Daou, J. M. Greneche, G. Pourroy, S. Buathong, A. Derory, C. Ulhaq-Bouillet, B. Donnio, D. Guillon, and S. Begin-Colin, *Chem. Mater.*, 2008, **20**, 5869–5875.
4. P. Tartaj, M. del Puerto Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. González-Carreno, and C. J. Serna, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2003, **36**, R182.
5. S. Yusan and S. Akyil Erenturk, *Desalination*, 2010, **263**, 233–239.
6. O. Pascu, E. Carenza, M. Gich, S. Estradé, F. Peiró, G. Herranz, and A. Roig, *J. Phys. Chem. C*, 2012, **116**, 15108–15116.
7. C. Sun, J. S. Lee, and M. Zhang, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2008, **60**, 1252–1265.
8. K. Nadeem, H. Krenn, T. Traussnig, R. Wurschum, D. V. Szabo, and I. Letofsky-Papst, *J. Appl. Phys.*, 2012, **111**, 113911–113911.
9. C. de Montferrand, Y. Lalatonne, D. Bonnin, N. Lièvre, M. Lecouvey, P. Monod, V. Russier, and L. Motte, *Small*, 2012, **8**, 1945–1956.
10. E. Tronc, D. Fiorani, M. Noguès, A. M. Testa, F. Lucari, F. D'Orazio, J. M. Grenèche, W. Wernsdorfer, N. Galvez, and C. Chanéac, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2003, **262**, 6–14.
11. S. Mørup, M. F. Hansen, and C. Frandsen, *Beilstein J. Nanotech.*, 2010, **1**, 182–190.
12. J.-F. Berret, N. Schonbeck, F. Gazeau, D. El Kharrat, O. Sandre, A. Vacher, and M. Airiau, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 1755–1761.
13. S. Linderroth, P. V. Hendriksen, F. Bødker, S. Wells, K. Davies, S. W. Charles, and S. Mørup, *J. Appl. Phys.*, 1994, **75**, 6583–6585.
14. M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, M. I. Montero, C. J. Serna, A. Roig, L. Casas, B. Martínez, and F. Sandiumenge, *Chem. Mater.*, 1999, **11**, 3058–3064.
15. K. L. Krycka, R. A. Booth, C. R. Hogg, Y. Ijiri, J. A. Borchers, W. C. Chen, S. M. Watson, M. Laver, T. R. Gentile, and L. R. Dedon, *Phys. Rev. Lett.*, 2010, **104**, 207203.
16. A. Millan, A. Urtizberea, N. J. O. Silva, F. Palacio, V. S. Amaral, E. Snoeck, and V. Serin, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2007, **312**, L5–L9.
17. B. H. Kim, N. Lee, H. Kim, K. An, Y. I. Park, Y. Choi, K. Shin, Y. Lee, S. G. Kwon, and H. B. Na, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 12624–12631.
18. A. Demortiere, P. Panissod, B. P. Pichon, G. Pourroy, D. Guillon, B. Donnio, and S. Begin-Colin, *Nanoscale*, 2011, **3**, 225–232.
19. A. M. Andersen, A. Mostad, C. Rømming, O. Smidsrød, O. Dahl, O. Buchardt, and G. Schroll, *Acta Chem. Scand.*, 1975, **29b**, 45–50.
20. J. Park, E. Lee, N.-M. Hwang, M. Kang, S. C. Kim, Y. Hwang, J.-G. Park, H.-J. Noh, J.-Y. Kim, and J.-H. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **117**, 2932–2937.
21. M. Hanson, C. Johansson, M. S. Pedersen, and S. Morup, *J. Phys.: Condens. Matter*, 1995, **7**, 9269.
22. J. M. Vargas, L. M. Socolovsky, M. Knobel, and D. Zanchet, *Nanotechnology*, 2005, **16**, S285.
23. N. Lee and T. Hyeon, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2575–2589.

Chapitre 5

Evaluation biologique et approche théranostique

Dans les chapitres précédents, nous avons détaillé l'élaboration de nanoplateformes d'oxyde de fer fonctionnalisées par différentes molécules (fluorophore, PEG et RGD). L'affinité de ces nanoplateformes vis-à-vis des intégrines a été vérifiée précédemment par un dosage de liaisons sur support solide. Dans la première partie de ce chapitre, nous présentons les premiers résultats obtenus sur l'évaluation de l'efficacité de ciblage des nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA-(\text{PEG-RGD})$ (chapitre 2), *in vitro* et *in vivo*, sur différents types tumoraux (glioblastomes U87MG ou carcinomes du colon CT26) ou sur des plaques d'athérome. Dans la seconde partie, nous nous intéresserons à la conception d'une nanoplateforme théranostique, comportant un agent de ciblage de type RGD et un agent cytotoxique, dérivé de la thapsigargine. Les premiers résultats *in vitro*, obtenus sur les cellules CT26, sont discutés.

I. Evaluation biologique

I. 1. Ciblage des tumeurs

L'expression des intégrines $\alpha_v\beta_3$ dans les cellules cancéreuses est corrélée à la progression de différents types de tumeurs via leur angiogénèse. Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement au ciblage de glioblastomes *in vitro* et de carcinomes du colon *in vivo*.

I. 1. 1. Ciblage de glioblastomes *in vitro*

La plupart des études en biologie cellulaire s'effectue sur des supports spécifiques permettant le développement des cellules sous forme de monocouche 2D. Cette technique mène à un environnement cellulaire bien contrôlé et homogène, facilite les analyses microscopiques et permet la prolifération cellulaire de beaucoup de types cellulaires. Cependant, elle ne prend pas en considération le microenvironnement naturel des cellules, impactant leur fonctionnement, la production ou l'expression de certaines protéines ainsi que leur développement.¹ Ainsi, une couche 2D n'est pas à même de reproduire les propriétés observées dans les tissus. Les études réalisées en deux dimensions conduisent alors à une approximation des effets observés *in vivo*. Afin d'obtenir des modèles *in vitro* plus proches des tissus *in vivo*, des cultures en 3D ont été développées. Les comportements différents observés entre ces deux types de culture cellulaire sont principalement attribués aux interactions cellule-cellule ou cellule-matrice. Un problème majeur de la croissance des

cellules en 3D peut être d'assurer la survie des cellules centrales puisqu'une fois entourées de couches de cellules, ces dernières n'ont plus accès aux nutriments, se trouvent en hypoxie et meurent. Cependant, ceci n'est pas un inconvénient dans le cas des tumeurs cancéreuses étant donné que le même phénomène est observé.

Plusieurs techniques ont été mises en place pour cultiver des cellules en trois dimensions. On pourra citer notamment la technique de centrifugation, la croissance cellulaire sur une surface non adhérente ou la méthode de la goutte suspendue, où les cellules s'agrègent spontanément vers le bas de la goutte après l'inversion du support et qui permet la production de sphéroïdes de taille homogène.² C'est cette dernière technique qui a été utilisée pour réaliser une étude concernant le ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ surexprimées par les cellules de glioblastomes (U87MG, Humain glioblastome cérébral). Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr S. Mériaux (CEA Neurospin). Les premiers résultats sont présentés ci-dessous.

Les cellules U87MG sont cultivées en gouttes inversées dans du milieu de culture (DMEM/10%FBS) pendant quelques jours. Les nodules, une fois formés, sont déposés sur du Matrigel® (25%, en milieu de culture complet), un mélange protéique gélatineux extrait de sarcomes de la souris, qui reproduit l'environnement naturel des cellules et influence leur croissance en 3D et leur fonctionnement. Des nodules sphériques, d'environ 5 mm, ont été choisis pour réaliser les diverses manipulations, Figure 1.



Figure 1 : Photographie de nodules dans le Matrigel (25%)

Les nanoplateformes utilisées lors de cette étude sont les nanoplateformes témoin $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ (non fonctionnalisées) et les nanoplateformes fonctionnalisées $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA-(\text{PEG-RGD}) R=2$, présentant une soixantaine de peptides de type RGD (cf chapitre 2).

Les nodules sont mis en contact 24h avec l'agent de contraste fonctionnalisé ou non fonctionnalisé (voir protocole en Annexe 7), dans du milieu de culture (sans Matrigel®). A l'issue de cette incubation, des lavages par changement de milieu sont effectués. Un changement de coloration, ainsi que des amas bruns sur la couronne des nodules sont observés à l'œil nu. La Figure 2 montre les photographies des nodules prises au microscope. Elles montrent que le matrigel, qui se trouve entre les cellules, est coloré en brun dans les deux conditions, cependant il semble que des points bruns apparaissent dans les cellules lorsque la nanoplateforme est fonctionnalisée par le peptide. La différence la plus notable concerne la structure en réseau. En effet, celle-ci est préservée en condition non fonctionnalisée alors qu'elle est altérée dans le deuxième cas. Des cellules arrondies sont ainsi observées à la place des cellules de forme allongées organisées en réseau. Un résultat similaire avait déjà été observé sur des cultures 2D où la fixation du peptide sur l'intégrine était à l'origine d'un arrondissement des cellules. Ceci est donc en faveur du ciblage spécifique des cellules U87MG par les nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}-(\text{PEG-RGD})$.

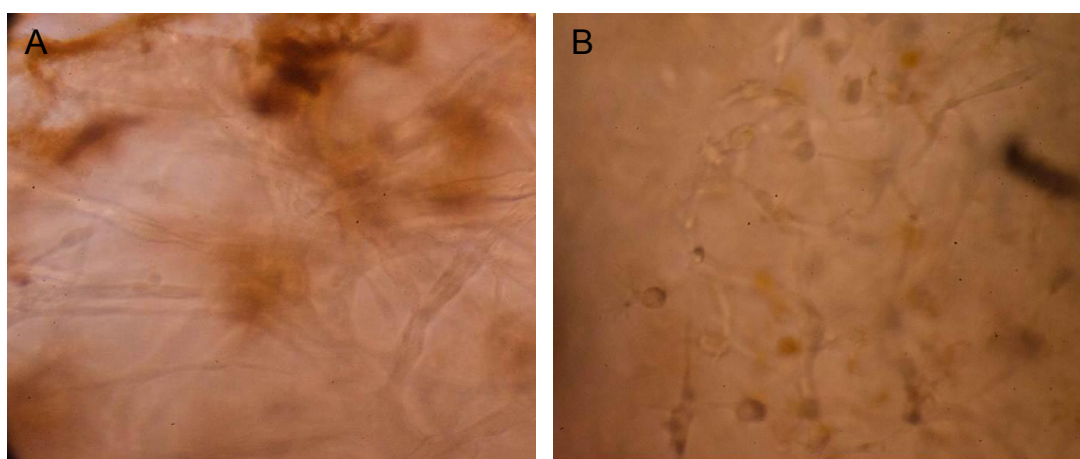


Figure 2 : Photographies de nodules en lumière blanche en sortie de l'incubateur après rinçage, incubés en présence de nanoparticules (A) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ ou (B) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}-(\text{PEG-RGD})$ R=2

Les cartographies T2 des nodules ont été réalisées sur un IRM 7T et sont présentées Figure 3. En comparaison avec le nodule témoin, un hyposignal est observé après incubation des nanoparticules, confirmant leur présence dans les nodules. Cependant il n'est pas possible de distinguer les deux conditions sur ces clichés. Ceci est lié à la présence des nanoparticules se trouvant dans le matrigel entourant les cellules de la couronne. Il convient ainsi de trouver un moyen efficace de rinçage afin de s'affranchir au mieux de cette part non spécifique.

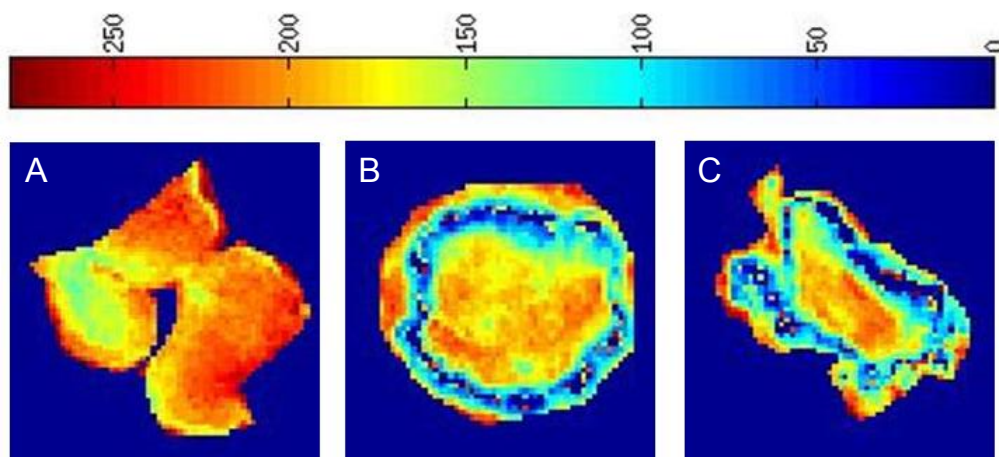


Figure 3 : Carte paramétrique T2 des nodules (A) témoin et incubés en présence des nanoparticules (B) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ ou (C) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}-(\text{PEG-RGD})$ R=2

Par ailleurs, les relaxivités des agents ont été réalisées sur cet IRM préclinique 7T. Ces valeurs pourraient permettre de remonter à la concentration en fer dans chaque nodule. En effet, les nanoparticules de fer vont abaisser le signal T2 et cette baisse sera inversement proportionnelle à la concentration de cet agent (équation 1) :

$$\frac{1}{T_2^{[Fe]}} = \frac{1}{T_2^{[Fe]=0}} + r_2 \cdot [Fe] \quad (1)$$

Les mesures ont été effectuées sur une gamme de concentration de 0.005 à 0.25 mM en fer, dans l'agarose à 3% et à 37°C. Les valeurs obtenues sont regroupées dans le Tableau 1 et sont comparées à celles obtenues sur un IRM clinique 1.5T dans le Chapitre 2. L'augmentation du champ engendre une augmentation de la relaxivité r_2 et une diminution du r_1 . Ce phénomène a été observé par Cheng *et al.*³ sur l'agent de contraste Resovist® ou par Simon *et al.*⁴ sur l'agent de contraste Sinerem®. Cependant, il est à noter que le conditionnement des échantillons est différent (eau, température ambiante sur l'IRM 1.5T, et agarose 3%, 37°C sur l'IRM 7T) et pourrait avoir une influence sur les valeurs obtenues.

	r_1 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)		r_2 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	
	1.5 T	7 T	1.5 T	7 T
$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$	7.4	0.83	186	197
$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}-(\text{PEG-RGD})$ R=2	7.5	0.83	174	244

Tableau 1 : Relaxivités des nanoplateformes $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}-(\text{PEG-RGD})$ R=2, mesurées sur un IRM clinique 1.5T (eau, T_{amb}) et un IRM préclinique 7T (agarose 3%, 37°C)

La suite de cette étude, concernant notamment l'amélioration du protocole de lavage, et la quantification en fer dans le nodule, est actuellement en cours.

I. 1. 2. Ciblage du carcinome du colon

Le ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ a également été exploré pour le ciblage de tumeurs de carcinomes du colon (CT26 souris⁵) *in vivo*. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'UMR 8151 CNRS (Université Paris Descartes). Les chercheurs de l'unité particulièrement impliqués sont : N. Mignet, B.T. Doan, J. Seguin et G. Ramnicanu.

Les nanoplateformes utilisées lors de cette étude sont la nanoplateforme témoin $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA-PEG}$ R=2, présentant une soixantaine de molécules PEG et les nanoplateformes fonctionnalisées $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}-(\text{PEG-RGD})$ R=0.2 ou R=2, présentant respectivement une trentaine et une soixantaine de peptides de type RGD, chapitre 2.

La cytotoxicité et l'internalisation cellulaire des nanoparticules ont d'abord été évaluées *in vitro* sur les cellules CT26. L'étude de cytotoxicité a été réalisée à l'aide du réactif MTT. Le principe et le protocole de ce test sont rappelés en Annexe 7. La Figure 4A montre les résultats obtenus pour les trois nanoplateformes après 24h d'incubation. Dans tous les cas, une toxicité maximale d'environ 30% est observée à la concentration de 0.5 mM en fer. Ainsi les nanoparticules peuvent être considérées comme étant peu toxiques pour les cellules CT26 et donc biocompatibles. L'internalisation des nanoparticules a été évaluée après 2h d'incubation selon le protocole décrit en Annexe 7. La quantité de fer internalisée a été détectée par absorbance suite à la lyse des cellules dans l'acide et les résultats sont présentés Figure 4B. Le pourcentage de particules adhérant au fond d'un puits sans cellule a été vérifié et s'est avéré négligeable (0.49%, 0% et 0.19% respectivement pour $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA-PEG}$, $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}-(\text{PEG-RGD})$ R=0.2 et R=2). Selon cette méthode, une internalisation n'est détectable qu'à partir d'une concentration en fer de 3.75 mM. Le pourcentage de nanoparticules internalisées est plus important lorsqu'elles sont fonctionnalisées avec un motif RGD et reste stable quelle que soit la quantité de peptides couplées (environ 3.5% contre 0.5% pour les non fonctionnalisées). Cette différence peut être liée à la reconnaissance des intégrines par les nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}-(\text{PEG-RGD})$.

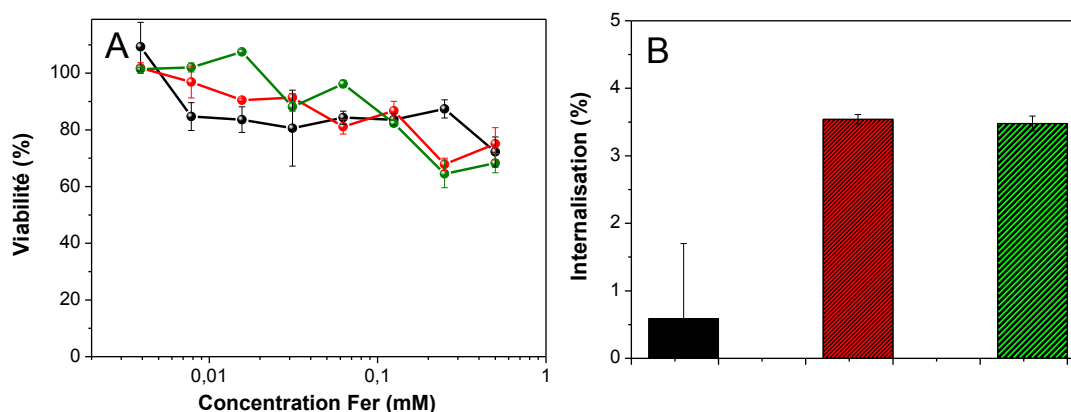


Figure 4 : (A) Viabilité cellulaire (%) des cellules CT26 en fonction de la concentration en nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@CA-PEG}$ (courbe noire) et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@CA-(PEG-RGD)}$ R=0.2 (courbe rouge) et R=2 (courbe verte) (B) % d'internalisation cellulaire des nanoparticules à une concentration de 3.75 mM en fer

La capacité des nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@CA-PEG}$ R=2 et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@CA-(PEG-RGD)}$ R=2 à cibler les tumeurs a été évaluée *in vivo*. Les nanoparticules non fonctionnalisées devraient permettre de rendre compte du ciblage passif dans les tumeurs. Les nanoparticules fonctionnalisées, dont le ciblage vis-à-vis des intégrines a été vérifié par des études *in vitro* (Chapitre 2), devraient induire un ciblage actif au voisinage des tumeurs, complémentaire à l'effet EPR, et ainsi augmenter la spécificité de la nanoplateforme. Les études ont ainsi été réalisées 11 jours après implantation bilatérale sous cutanée de fragments de tumeurs CT26 de 20-30 mm³. (Annexe 7) Les nanoparticules sont injectées par voie intraveineuse à une dose de 5.5 mg Fer/kg (100 μL à 20 mM en Fer) via un cathéter positionné dans la veine caudale. Les images IRM pondérées T2* sont réalisées à 7T, selon les paramètres détaillés en Annexe 7, à différents temps après l'injection (de 10 min à environ 4h) et comparés à l'image de référence (avant injection). Les Figures 5 et 6 montrent les résultats obtenus respectivement pour la nanoplateforme témoin et celle fonctionnalisée.

Ces nanoparticules ne présentent pas de toxicité aigue envers les animaux. En effet, aucun effet secondaire (comportement, aspect extérieur, ...) n'a été observé pendant l'injection, immédiatement ou 4 jours après les injections. Cependant, une étude plus détaillée serait requise pour accéder à la toxicité de ces produits.

En ce qui concerne toutes les nanoplateformes, les images montrent un hyposignal important dans le foie dès 10 min après l'injection, Figure 5B'. Cette accumulation hépatique est typique des nanoparticules et est en faveur de leur élimination par les cellules du système réticulo-endothélial, principalement celles de Kupffer. Ce profil est similaire à celui observé pour l'agent de contraste Resovist®, qui se concentre de manière importante dans le foie (environ 80% de la dose injectée) seulement quelques minutes après son administration.⁶

Cependant, contrairement à notre attente, pour la nanoplateforme non fonctionnalisée RGD, il n'est pas observé de signal dans les tumeurs (n=6) après l'injection, Figure 5B-C-D. Il apparaît ainsi que le temps de circulation dans le sang de nos nanoparticules n'est pas suffisant pour induire une accumulation par effet EPR dans les tumeurs, que celui-ci n'est pas suffisamment favorable et/ou que la technique d'imagerie employée n'est pas assez sensible. Les expériences réalisées par Kunjachan *et al.*⁷ ont permis de visualiser le ciblage passif au niveau des tumeurs CT26. Ainsi, l'hypothèse d'une faible accumulation alliée à une faible sensibilité de l'imagerie IRM est la plus probable.

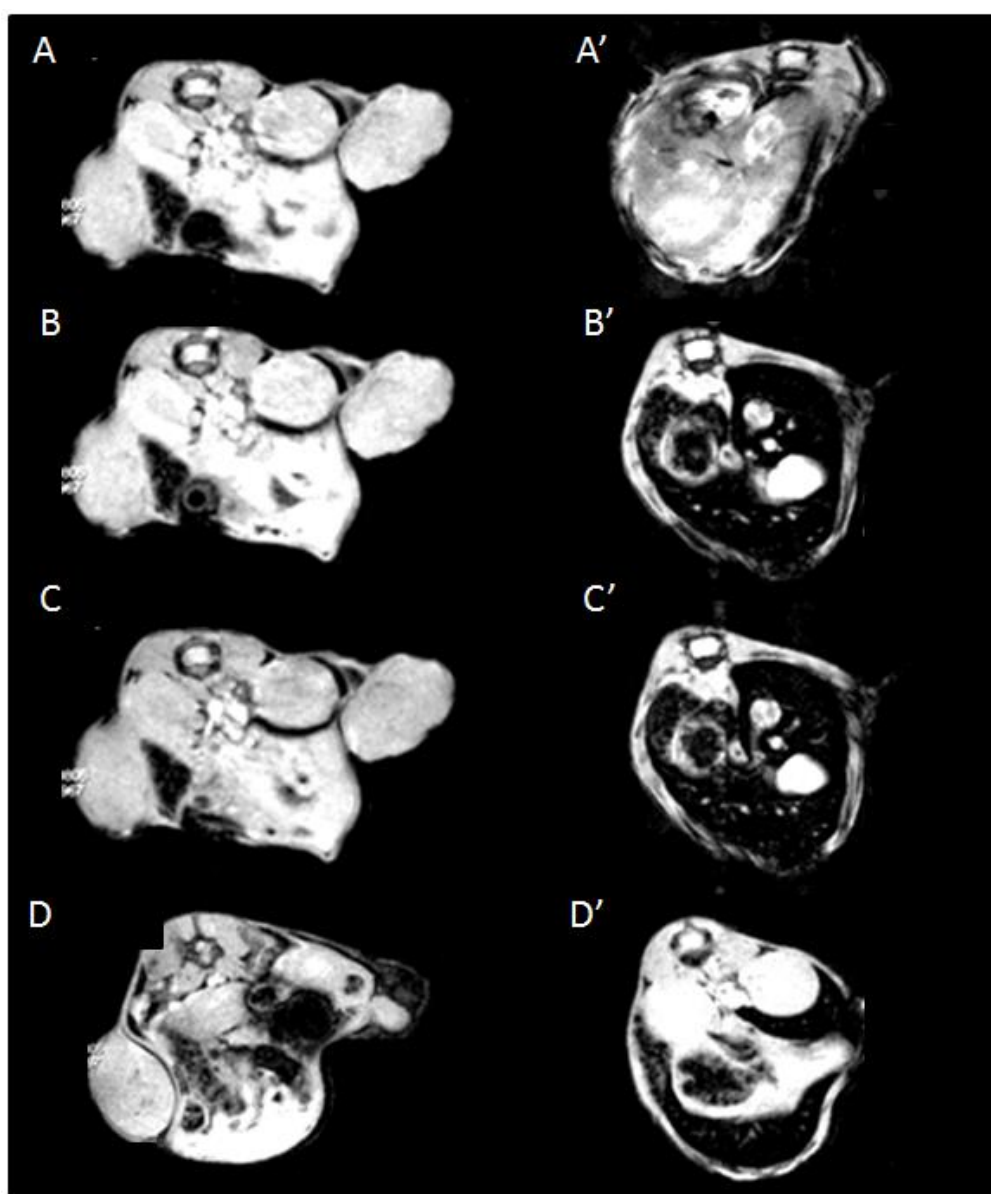


Figure 5 : Images T2* des tumeurs et du foie (A et A') avant injection et 10min (B et B'), 45min (C et C'), et 4h (D et D') après injection des nanoparticules $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@CA-PEG R=2}$. Il est à noter que les souris ont reçu deux doses à 24h d'intervalle et que les images des tumeurs correspondent à une visualisation lors de la seconde injection.

En ce qui concerne la nanoplateforme fonctionnalisée RGD, les images post-injection montrent, en plus d'une accumulation importante dans le foie similaire à celle observée précédemment, l'apparition de points noirs dans les tumeurs (n=3) dès les premières minutes, Figure 6B. Ces hyposignaux rendent compte de la présence des nanoparticules d'oxyde de fer et mettent en exergue le ciblage actif des nanoparticules fonctionnalisées. Ainsi, les résultats démontrent une interaction entre les peptides RGD et les intégrines $\alpha_v\beta_3$, qui est encore visible 3h30 après l'injection, Figure 6D.

Afin de quantifier cette spécificité de ciblage, les souris ont été sacrifiées et les organes prélevés. Une analyse par ICP-MS doit être réalisée après digestion acide des organes pour quantifier le fer présent dans les tumeurs, et le foie.

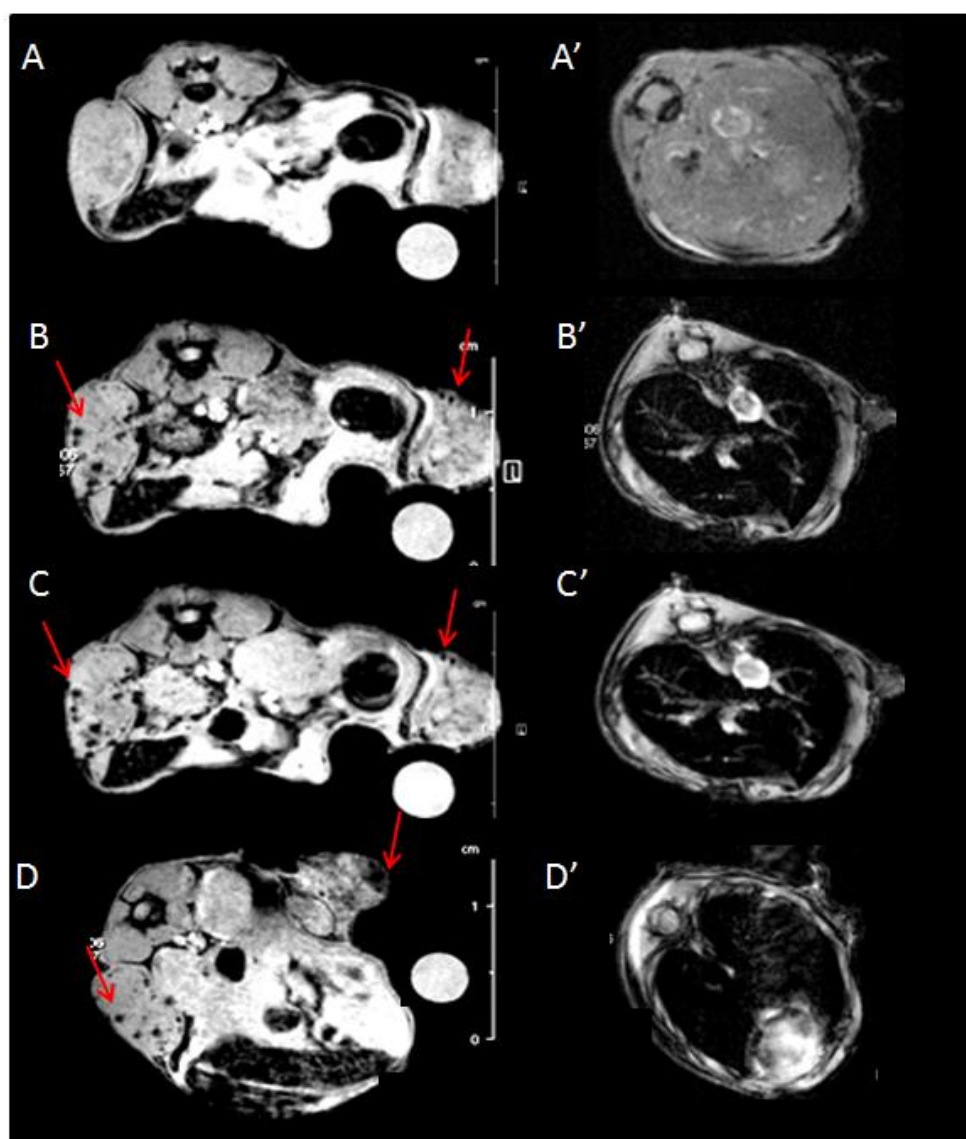


Figure 6 : Images T2* des tumeurs et du foie (A) avant injection et 10min (B), 45min (C), et 3h30 (D) après injection des nanoparticules $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@CA-(PEG-RGD)}$ R=2. Il est à noter que les souris ont reçu deux doses à 24h d'intervalle et que les images des tumeurs correspondent à une visualisation lors de la seconde injection.

Ces résultats montrent le potentiel de la nanoplateforme $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@CA-(PEG-RGD)}$ R=2 à cibler *in vivo* les tumeurs ectopiques CT26. Cependant, en vue d'optimiser cette plateforme, une amélioration de l'habillage de surface serait nécessaire afin d'augmenter la furtivité et décupler le contraste résultant (ciblage passif et ciblage actif). Une telle amélioration pourrait être réalisée en introduisant sur la nanoplateforme des chaînes PEG beaucoup plus grandes, capables de repousser de manière plus conséquente les protéines plasmatiques reconnues par les macrophages du foie. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé la nanoplateforme $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH-PEG}$ (2kD, 40 unités), la seule synthétisée, au cours de ce travail, avec des chaînes PEG longues (chapitre 3). L'expérience a été réalisée de la même manière que précédemment. Les clichés IRM des tumeurs et du foie obtenus à différents temps après l'injection sont présentés Figure 7. En plus de l'hyposignal attendu et observé dans le foie, des hyposignaux (points noirs) apparaissent dans la région tumorale 10 min après l'injection, et démontre un ciblage passif, qui pourrait être attribué à la plus longue chaîne PEG choisie. Evidemment, étant donné que le ligand de surface diffère, il faudrait compléter et confirmer cette étude, en vérifiant notamment qu'un ciblage passif n'est pas ou peu observé dans le cas de la nanoplateforme $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH-PEG}$ (4 unités).

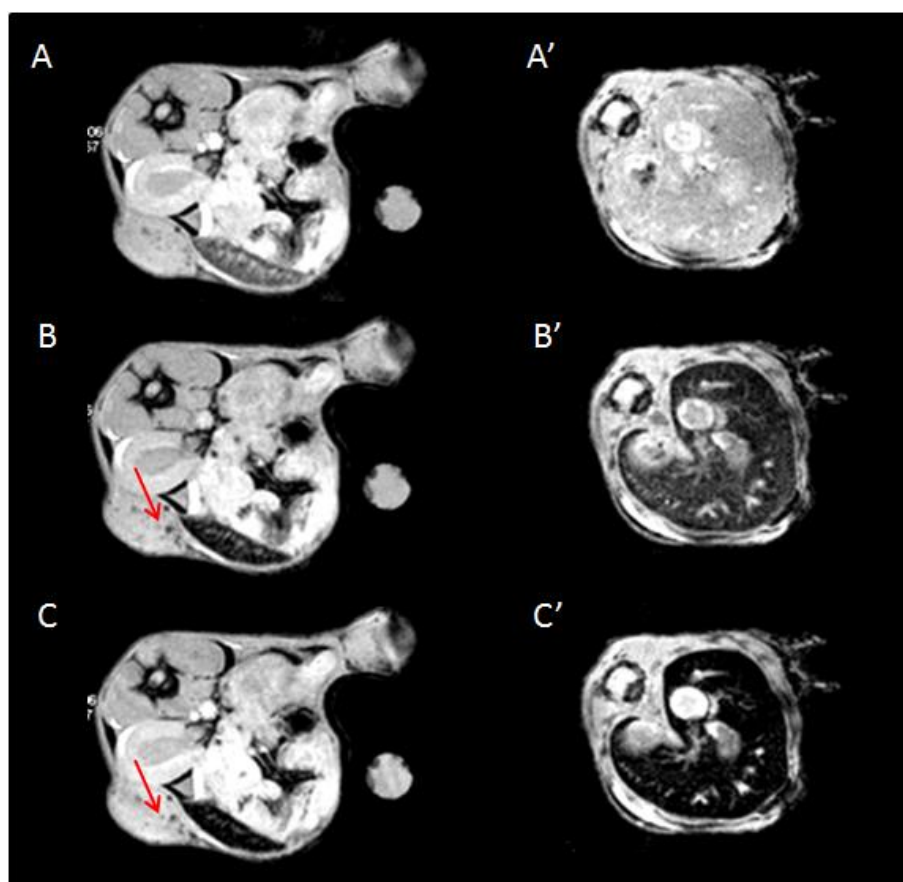


Figure 7 : Images T2* des tumeurs et du foie (A) avant injection et 10min (B), 1h (C), après injection des nanoparticules $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH-PEG}$ (2kD)

La nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}-(\text{PEG-RGD})$ a ainsi été utilisée pour le ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ *in vitro* sur des glioblastomes et *in vivo* sur des carcinomes. Comme décrit dans le Chapitre 1, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ jouent également un rôle important dans d'autres maladies telles que l'athérosclérose. Ainsi, le potentiel de ciblage des plaques d'athéromes par cet agent de contraste a été évalué *in vitro*.

1. 2. Ciblage de l'athérosclérose

Les intégrines $\alpha_v\beta_3$ sont fortement exprimées dans les plaques d'athérome par les cellules musculaires lisses du média et de l'intima. Une étude *in vitro* a ainsi été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr G. Clofent-Sanchez (Université de Bordeaux 2, UMR 5536 CNRS) sur des plaques d'athérome de lapin. Les coupes ont été préparées selon le protocole décrit en Annexe 7. Les nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ ou $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}-(\text{PEG-RGD})$ ($R=2$), diluées dans du PBS, sont ajoutées et laissées incuber toute la nuit à 4°C. Après plusieurs lavages, un marquage au bleu de Prusse est réalisé. (Annexe 7) Cette technique permet de colorer en bleu tous composés à base de fer présents dans les cellules. La Figure 8 présente les photographies prises après marquage des coupes d'athérome. Une coloration bleue apparaît uniquement après incubation des nanoparticules présentant des motifs RGD. Ainsi la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}-(\text{PEG-RGD})$ ($R=2$) permet la reconnaissance spécifique des intégrines via les motifs RGD. Son utilisation pour le ciblage de l'athérosclérose *in vivo* peut donc être à envisager.

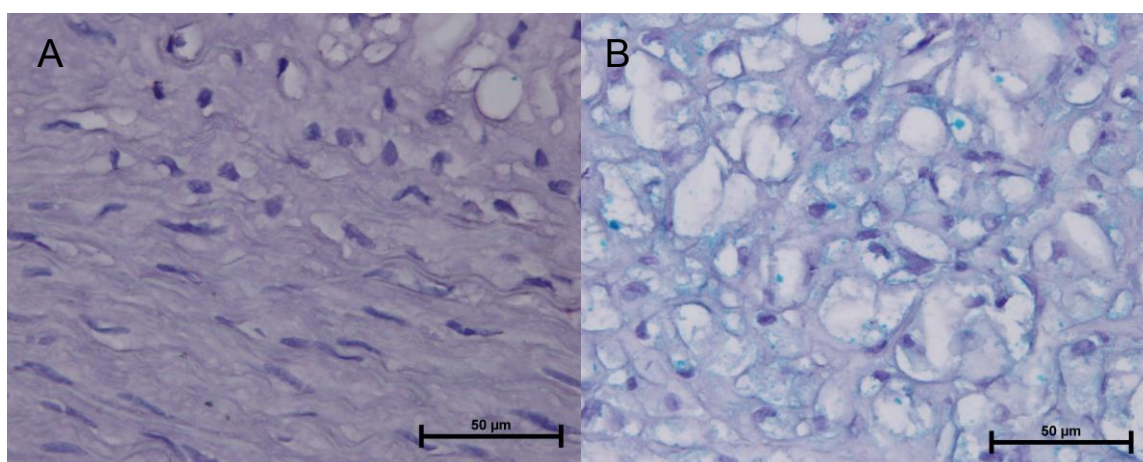


Figure 8 : Plaques d'athérome de lapin après incubation des nanoparticules (A) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}$ ($c_{\text{Fe}}=2.7\text{mM}$) et (B) $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{CA}-(\text{PEG-RGD})$ $R=2$ ($c_{\text{Fe}}=2.7\text{mM}$ $c_{(\text{PEG-RGD})}=10\mu\text{M}$) et révélation Bleu de Prusse (grossissement *40)

Ainsi ces études ont montré le potentiel de ciblage des intégrines de nos nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées avec un motif RGD, que ce soit pour le diagnostic IRM de

cancers ou potentiellement pour celui de l'athérosclérose. Par ailleurs, il a été montré dans le chapitre 1, l'émergence de systèmes multifonctionnels combinant le ciblage et des propriétés effectrices. Ainsi dans cette seconde partie, nous nous intéresserons à l'élaboration d'un agent de contraste théranostique et détaillerons les premiers résultats obtenus. Ce travail a été réalisé parallèlement à l'étude précédente, en collaboration avec l'UMR 8638 (pour la synthèse organique) et l'UMR 8151 (pour l'évaluation biologique), suite à l'ANR THASER (porteur Pr J. Ardisson). Le choix de la molécule cytotoxique s'est porté sur la thapsigargine.

II. Vers un agent de contraste théranostique

II. 1. Les thapsigargines

Les thapsigargines sont un groupe de lactones sesquiterpéniques issues d'espèces de la famille des *Apiaceae*, et plus particulièrement du genre *Thapsia*. Ce sont des structures complexes incorporant de nombreux centres stéréogènes, des fonctions esters et des alcools tertiaires. Elles ne diffèrent entre elles que par la nature de deux esters en positions 2 et 8, Figure 9.⁸

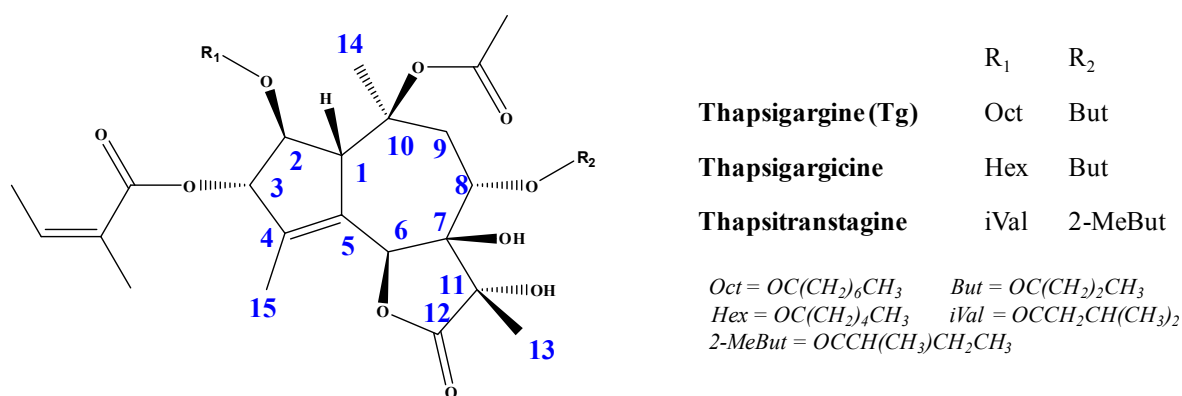


Figure 9 : Formule générale des thapsigargines et 3 exemples de molécules appartenant à ce groupe : la thapsigargine, la thapsigargine, la thapsitranstagine

Dans ce groupe, la thapsigargine (Tg) est la représentante la plus importante et la plus étudiée. Elle est principalement extraite des racines de *Thapsia Garganica*, une plante vivace présente sur la côte Méditerranéenne.⁹ Cet irritant naturel, facilement absorbé par la peau, est connu depuis l'antiquité pour ses propriétés médicinales. Des onguents préparés à partir de ses racines servaient alors à soulager les rhumatismes et certains maux pulmonaires.¹⁰ Son

activité cytotoxique, 10 à 100 fois plus importante que les agents cytotoxiques de référence (paclitaxel ou doxorubicine), a été montrée des années plus tard sur une large gamme de types cellulaires normaux ou cancéreux.¹¹ Cet effet, non sélectif, ne dépend donc pas du taux de prolifération cellulaire, ce qui contraste avec les agents de référence ciblant principalement les cellules en prolifération. Elle a ainsi montré un intérêt majeur pour le traitement du cancer de la prostate.¹² Son mécanisme d'action se révèle être directement lié à l'inhibition des pompes SERCA, des protéines membranaires qui transportent les ions Ca^{2+} du cytosol (phase liquide dans laquelle baignent les organites cytoplasmiques à l'intérieur de la cellule) vers le réticulum (réserve interne d'ions Ca^{2+}). La pompe SERCA existe sous deux formes dites E1 et E2, Figure 10. La première lui permet de fixer deux Ca^{2+} cytosoliques et une molécule d'ATP. Le changement de forme vers E2 nécessite la consommation d'énergie via l'hydrolyse de l'ATP. En ce qui concerne la Tg, sa lipophilie lui permet de traverser librement la membrane cellulaire. Elle vient ensuite bloquer la pompe SERCA dans sa conformation E2. L'arrêt de ses pompes engendre une rupture homéostatique dans la cellule : le stock de Ca^{2+} du réticulum se vide dans le cytosol via des canaux passifs. Cette surélévation induit une cascade métabolique aboutissant à la mort de la cellule.

Afin d'introduire un groupement réactif et ainsi d'envisager le couplage de la Tg sur un vecteur, des études ont suggéré que la Tg pouvait être modifiée en position 8 sans compromettre de manière significative son inhibition vis-à-vis des pompes SERCA.¹¹

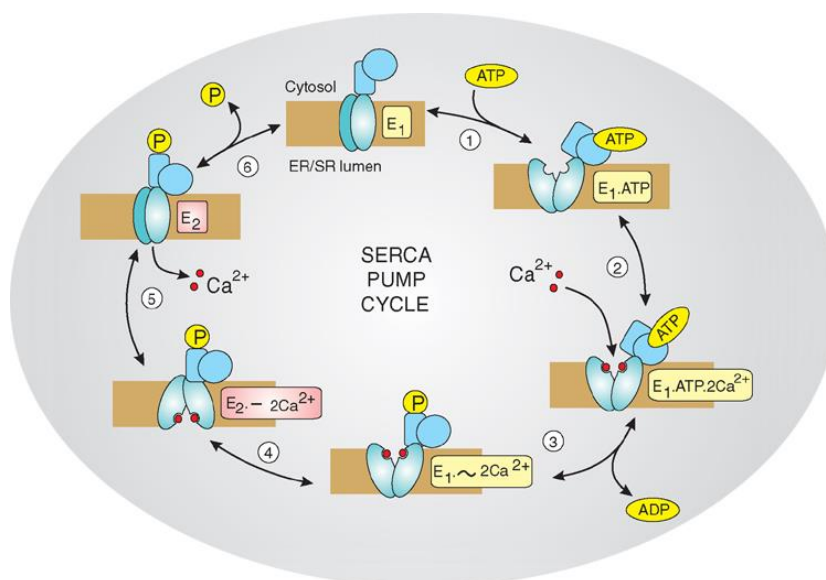


Figure 10 : Le mécanisme des pompes SERCA (Berridge, M.J. (2012) Cell Signalling Biology)

II. 2. Elaboration d'une nanoplateforme théranostique

Nous avons ainsi voulu coupler la Tg sur une nanoplateforme synthétisée précédemment. Le choix de la stratégie de couplage (carbodiimide ou click) a d'abord été discuté en fonction des protocoles précédemment établis (chapitre 2 et 3). La structure complexe de la Tg, présentant de nombreux groupes fonctionnels pouvant mener à des nombreuses réactions, s'est montrée en faveur d'une réaction se déroulant à pH neutre. Parmi les réactions de chimie click étudiées, la réaction de Huisgen a été préférée à la réaction thiol-yne, pour notre plus grande expertise concernant le couplage de molécules biologiques (RGD) ou présentant des groupements hydrophobes (Rhodamine) (chapitre 3).

Un analogue de la Tg, appelé Tg-PEG par la suite, présentant un « bras » avec une fonction azide terminale en position 8, a été synthétisé par les Dr. J. Perard et S. Boutefnouchet (Université Paris Descartes, UMR 8638 CNRS), et est présenté Figure 11. La glycine a été introduite sur la chaîne PEG, permettant ainsi d'introduire une fonction amide, qui s'avère utile pour la quantification par la méthode OPA. Cette molécule est soluble dans des solvants organiques de type DMF ou DMSO.

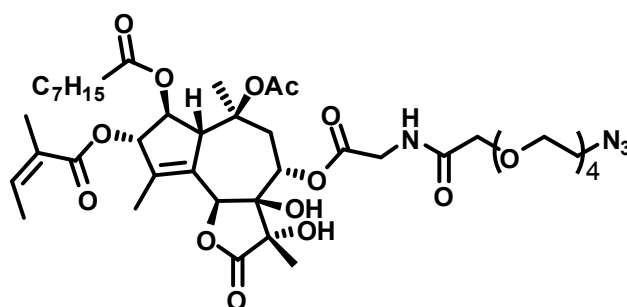


Figure 11 : Structure du dérivé Tg-PEG couplé sur la nanoplateforme $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH}$

Cet analogue de la Tg a ainsi été couplé sur la nanoplateforme $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH}$ et $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH}-(\text{PEG-cRGD})$ (cf chapitre 3) par chimie click. Le protocole de couplage est similaire à celui décrit dans le chapitre 3, cependant la réaction a été réalisée dans un mélange eau/DMF (50/50), et les premiers lavages ont été effectués dans un mélange eau pH 2/DMF (50/50). Le couplage a été opéré sous micro-ondes en utilisant les mêmes conditions opératoires que pour les peptides (cf chapitre 2, Tableau 3). L'intégrité de la molécule après une heure à pH 2 ou après micro-ondes a été vérifiée, au préalable, par CCM (100% acétate d'éthyle), validant ainsi le protocole utilisé.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 2. La Tg-PEG a d'abord été couplé sur la nanoplateforme $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH}$ pour différents ratios R. Nous pouvons observer qu'en augmentant ce ratio, le nombre de Tg-PEG par nanoparticule ainsi que la taille hydrodynamique augmente. Le couplage de la Tg-PEG sur la nanoplateforme $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH-(PEG-cRGD)}$ entraîne également une augmentation de la taille hydrodynamique. Dans les différents cas, le potentiel de surface reste négatif et est peu modifié. L'affinité de cette dernière nanoplateforme, a été réalisée sur support solide en présence du compétiteur radioactif, l' ^{125}I -Echistatine, et comparée à la nanoplateforme $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH-(PEG-cRGD)}$. L'affinité est légèrement plus faible (15 nM vs 8 nM), Figure 12, mais reste du même ordre de grandeur, montrant que la présence de la Tg-PEG déstabilise peu la reconnaissance du motif RGD par les intégrines. Ainsi, la présence du peptide sur la nanoplateforme, permettant le ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ pourrait donc induire un effet cytotoxique sélectif.

R (Tg-PEG)	Nbre Tg-PEG	% Tg-PEG	Nbre RGD	% RGD	D_h (nm)	Pdl	Zeta (mV)	IC50 (nM)	K_i (nM)
0	0	0	0	0	10	0.3	-52 ± 8	-	-
0.2	43 ± 8	10 ± 2	0	0	20	0.3	-44 ± 7	-	-
2	68 ± 7	15 ± 2	0	0	29	0.3	-45 ± 6	-	-
0	0	0	50 ± 5	11 ± 1	19	0.3	-43 ± 8	10	8
3	69 ± 6	16 ± 1	50 ± 5	11 ± 1	48	0.2	-42 ± 8	18	15

Tableau 2 : Nombre et % de Tg-PEG, Nombre et % de RGD par nanoparticule, propriétés hydrodynamiques (D_h et potentiel de surface), IC50 et constantes affinités

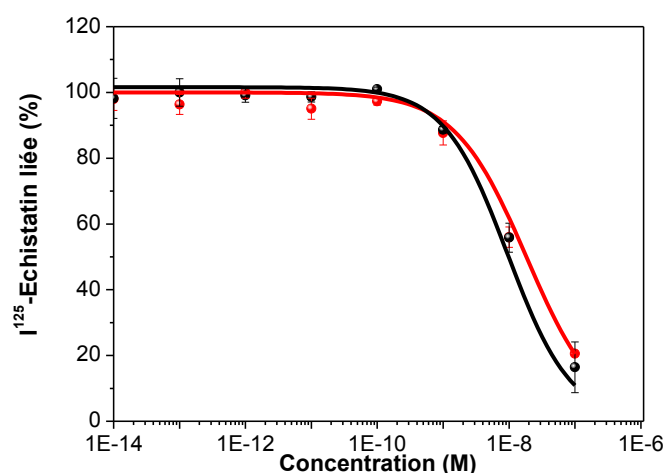


Figure 12 : Le compétiteur, ^{125}I -echistatine, a été ajouté à une concentration finale de 0.05 nM en présence de ligands compétiteurs à diverses concentrations. Après 3h de co-incubation, les puits sont lavés et la radioactivité est mesurée. Les nanoplateformes étudiées sont $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@HMBP-C}\equiv\text{CH-(PEG-cRGD)}$ avant (noir) et après couplage (rouge) de la Tg-PEG

II. 3. Résultats biologiques

Les tests de cytotoxicité de la Tg et des dérivés à 24H ont été réalisés sur les cellules CT26, à l'aide du réactif MTT. La Figure 13 montre les courbes obtenues et le Tableau 3 regroupe les valeurs d'IC₅₀ des différents composés. La Tg est très cytotoxique, puisqu'elle présente une IC₅₀ de 7.8 nM. La modification de la Tg en position 8, par l'introduction d'un groupement hydroxyle, entraîne une diminution de la cytotoxicité. L'IC₅₀ est ainsi de 107 nM pour la Tg-OH. Par ailleurs, l'introduction du groupement PEG sur la molécule induit une nouvelle diminution de la cytotoxicité, et l'IC₅₀ n'est plus que de 6.6 μ M pour la Tg-PEG.

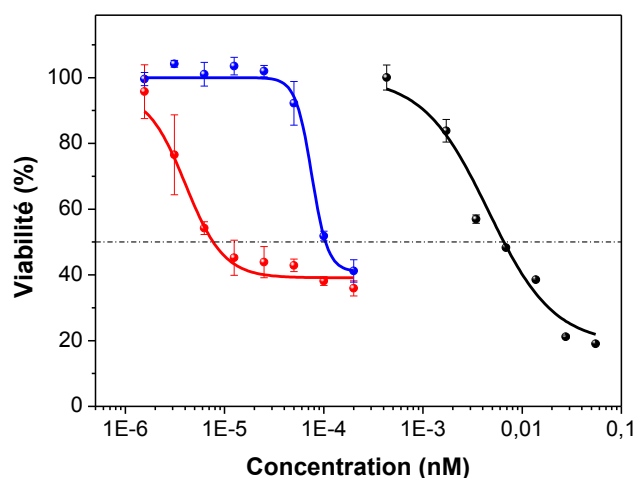


Figure 13 : Courbes représentant la viabilité cellulaire (%) (des cellules CT26) en fonction de la concentration en agent cytotoxique : Tg (courbe rouge), Tg-OH (courbe bleue) et Tg-PEG (courbe noire)

	Tg	Tg-OH	Tg-PEG
IC ₅₀ (nM)	7.8	107	6 600

Tableau 3 : IC₅₀ de la Tg et de ses dérivés : Tg-OH et Tg-PEG après incubation sur les cellules CT26

Les tests de cytotoxicité et d'internalisation cellulaire ont ensuite été réalisés sur les nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-C}\equiv\text{CH}$ (témoin) et sur les nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-C}\equiv\text{CH-(Tg-PEG)}$ R=0.2. Les résultats sont présentés Figure 14. La concentration maximum de Tg-PEG testée (4 μ M, proche de l'IC₅₀), n'est pas suffisante pour induire une différence significative de toxicité entre les deux types de nanoplateformes. L'internalisation cellulaire des particules, estimée par dosage du fer dans le culot cellulaire, est légèrement supérieure pour les particules avec la Tg-PEG (1.1 \pm 0.04% vs 0.5 \pm 0.4%) mais reste faible et pourrait expliquer ce dernier résultat.

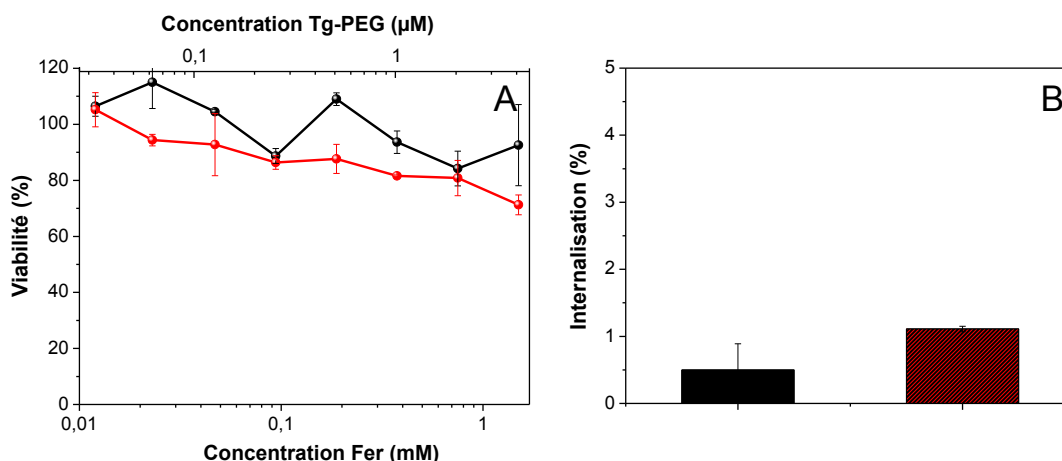


Figure 14 : (A) Viabilité cellulaire (%) (des cellules CT26) en fonction de la concentration en nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP}-\text{C}\equiv\text{CH}$ (courbe noire) et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP}-\text{C}\equiv\text{CH}-(\text{Tg}-\text{PEG})$ R=0.2 (courbe rouge) et % d'internalisation cellulaire des nanoparticules à une concentration de 3.75 mM en fer

Ainsi des modifications sont à envisager (augmentation de l'internalisation cellulaire et modification de la Tg-PEG) afin de parvenir à une nanoplateforme cytotoxique.

II. 4. Vers une amélioration de la nanoplateforme cytotoxique

Afin d'augmenter l'internalisation cellulaire, l'application d'un champ magnétique est proposé. En effet, il a été montré au laboratoire sur des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par de l'alendronate, une inhibition de la prolifération cellulaire des U87 plus importante en présence d'un champ magnétique.¹³ Une étude qualitative par marquage au bleu de Prusse, Figure 15 et une étude quantitative par dosage du fer dans le culot cellulaire, Figure 16 ont été réalisées sur les deux nanoplateformes précédemment décrites. Qualitativement, les marquages au bleu de Prusse montrent une augmentation significative de l'internalisation cellulaire à 2h pour les deux nanoplateformes lorsqu'il y a application d'un champ magnétique. En effet, une coloration bleue apparaît sur les photographies, indiquant la présence de fer. Cette observation est confirmée par le dosage du fer, et montre que l'internalisation est plus importante pour les particules avec Tg-PEG lors de l'application d'un champ magnétique ($3.6 \pm 0.6\%$ vs $0.7 \pm 0.3\%$). Par ailleurs, le pourcentage de nanoparticules adhérant au fond d'un puits sans cellule a été vérifié et s'est avéré négligeable. Ainsi, les pourcentages obtenus correspondent bien à des nanoparticules internalisées.

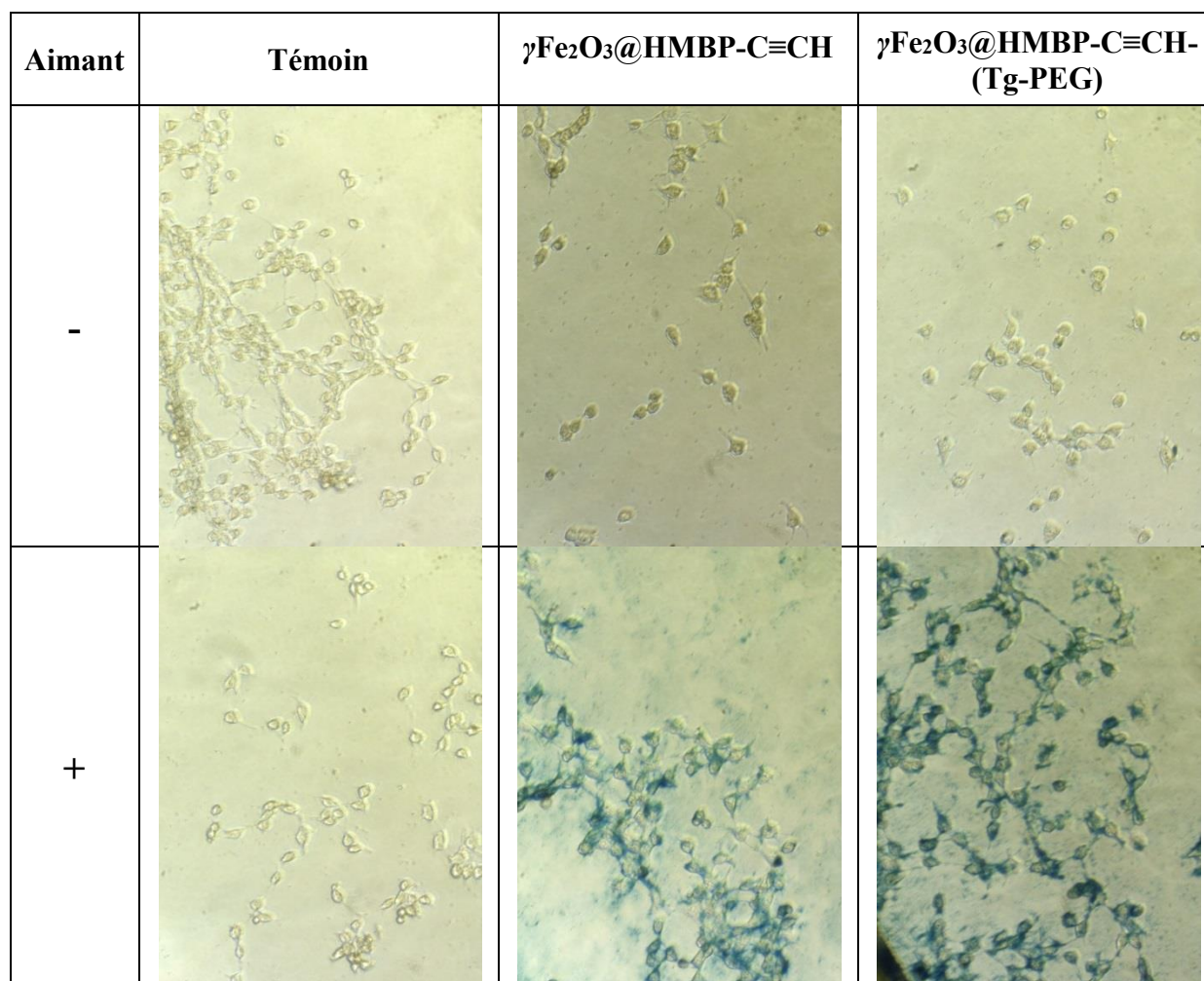


Figure 15 : Photographies des cellules sans nanoparticules et après dépôt des nanoparticules 3.75 mM avec et sans application de champ magnétique pendant 2h

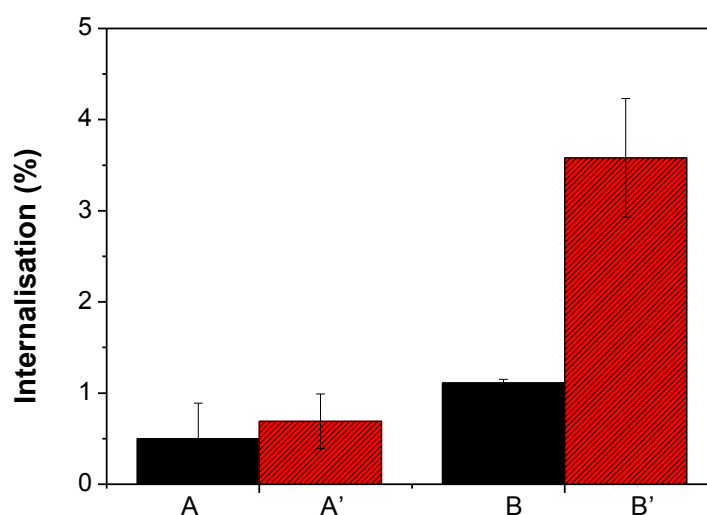


Figure 16 : % d'internalisation cellulaire des nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP}$ (A) et $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP}-(\text{Tg}-\text{PEG})$ (B) à une concentration de 3.75 mM en fer avec (en rouge) et sans (en noir) application d'un champ magnétique

De plus, afin d'augmenter la cytotoxicité de la Tg-PEG, une modification de la structure a été proposée, Figure 17. Elle consiste à allonger la chaîne aliphatique à proximité de la position 8. En effet, des études menées par l'équipe de Christensen sur différents analogues de la Thapsigargine ont montré qu'augmenter le nombre de groupements méthylènes ($-\text{CH}_2-$) entre les groupements amines et carboxylates pouvait avoir une influence. Ainsi les liens courts, inférieurs à 8 groupements méthylènes ont montré une faible activité inhibitrice des pompes SERCA, alors que les liens présentant plus de 10 groupes méthylènes peuvent avoir une activité similaire à la Tg.^{8,14,15}

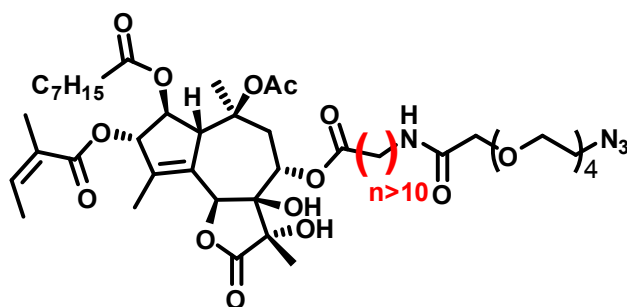


Figure 17 : Modification envisagée de la structure de la Tg-PEG

Par ailleurs, les études *in vivo* ont montré une forte accumulation des nanoparticules dans le foie, ce qui rend compte de la phagocytose par les cellules de Kupffer. Ainsi, si nous voulons élaborer un agent théranostique pour cibler des tumeurs, il est à envisager, d'une part, un travail sur la fonctionnalisation de surface des nanoparticules en introduisant des chaînes PEG plus longues permettant une augmentation du temps de circulation et ainsi une accumulation des nanoparticules dans la zone ciblée désirée afin d'obtenir une concentration locale cytotoxique suffisante. Cette dernière doit être obtenue en tenant compte notamment de la dose létale de la Tg, 0.8 mg/kg,⁸ estimée chez la souris après injection intraveineuse. En se basant sur les manipulations *in vivo* réalisées précédemment, une quantité de 100 μmol de Fer/kg (5.5 mg Fer/kg) a été injectée chez la souris, et en considérant une soixantaine de Tg par nanoparticules, nous arrivons à une dose de 0.26 mg/kg, inférieure à la dose létale. De plus, afin de limiter au maximum la cytotoxicité de la nanoplatforme aux tumeurs ciblées (en complément du peptide RGD), l'usage de la stratégie « prodrug » peut être envisagée. Ceci permet l'administration de la Tg sous une forme inactive, qui sera activée sélectivement dans les tissus tumoraux. Cette activation sélective tire profit des aspects uniques de la physiologie des tumeurs, tels que l'expression sélective d'enzymes, l'hypoxie ou le plus faible pH extracellulaire.¹⁶ Par exemple, l'équipe de Christensen *et al.* a envisagé des prodrogues de

thapsigargine pour le traitement du cancer de la prostate, libérées spécifiquement au sein de la tumeur prostatique après hydrolyse par les peptidases surexprimées *in situ*.¹⁵

Ainsi dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'évaluation biologique des nanoparticules d'oxyde de fer précédemment synthétisées et caractérisées. Le potentiel des nanoparticules $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$ fonctionnalisées par des séquences peptidiques de type RGD a été exploré pour le diagnostic de diverses pathologies. In vitro, le ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ a été constaté sur les sphéroïdes 3D de glioblastomes et sur des coupes de plaques d'athérome. In vivo, ces particules ont permis un ciblage des tumeurs (CT26, carcinomes du colon) implantées en sous-cutanée. En effet, des hyposignaux sont apparus dans la zone tumorale une dizaine de minutes après l'injection. Afin d'optimiser la plateforme, une amélioration de la furtivité est à envisager. Ceci permettrait d'augmenter l'effet de perméabilité et de rétention tissulaire (EPR) qui n'a pas été détecté par IRM in vivo dans le cas de la nanoplateforme non fonctionnalisée $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@CA$. L'expérience réalisée avec la nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@HMBP-C\equiv CH-PEG$ (2kD) est en faveur de cette hypothèse puisqu'elle a permis la visualisation d'hyposignaux dans la zone tumorale.

Par ailleurs la réalisation d'une nanoplateforme théranostique a été envisagée. Un dérivé de la thapsigargine (Tg-PEG) a été couplé sur les nanoparticules d'oxyde de fer $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@HMBP-C\equiv CH$ par chimie click. Cependant, l'étude in vitro, réalisée sur les cellules de carcinomes du colon, a montré une faible cytotoxicité de cette molécule. Ainsi, une optimisation de sa structure a été proposée en vue d'obtenir un composé présentant une cytotoxicité proche de la thapsigargine. Des études complémentaires devront être réalisées avant d'aboutir à cette nanoplateforme théranostique.

Références Bibliographiques

1. E. Fennema, N. Rivron, J. Rouwkema, C. van Blitterswijk, and J. de Boer, *Trends Biotechnol.*, 2013, **31**, 108–115.
2. J. M. Kelm, N. E. Timmins, C. J. Brown, M. Fussenegger, and L. K. Nielsen, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **83**, 173–180.
3. F.-Y. Cheng, C.-H. Su, Y.-S. Yang, C.-S. Yeh, C.-Y. Tsai, C.-L. Wu, M.-T. Wu, and D.-B. Shieh, *Biomaterials*, 2005, **26**, 729–738.
4. G. H. Simon, J. Bauer, O. Saborovski, Y. Fu, C. Corot, M. F. Wendland, and H. E. Daldrup-Link, *Eur Radiol*, 2006, **16**, 738–745.
5. J. Seguin, B.-T. Doan, H. Latorre Ossa, L. Jugé, J.-L. Gennisson, M. Tanter, D. Scherman, G. Chabot, and N. Mignet, *Int. J. Mol. Imaging*, 2013, **2013**.
6. P. Reimer and B. Tombach, *Eur Radiol*, 1998, **8**, 1198–1204.
7. S. Kunjachan, R. Pola, F. Gremse, B. Theek, J. Ehling, D. Moeckel, B. Hermanns-Sachweh, M. Pechar, K. Ulbrich, W. E. Hennink, G. Storm, W. Lederle, F. Kiessling, and T. Lammers, *Nano Lett.*, 2014.
8. S. B. Christensen, D. M. Skytte, S. R. Denmeade, C. Dionne, J. V. Moller, P. Nissen, and J. T. Isaacs, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2009, **9**, 276–294.
9. O. Anthony, G. Raphaël, C. Xavier, M. Djamila, A. Janick, B. Sabrina, and D. Brigitte, *J. Chromatogr. B*, 2013.
10. S. B. Christensen, A. Andersen, and U. W. Smitt, in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer, 1997, pp. 129–167.
11. S. R. Denmeade and J. T. Isaacs, *Cancer Biol. Ther.*, 2005, **4**, 14–22.
12. J. T. Isaacs, *BJU international*, 2005, **96**, 35–40.
13. F. Benyettou, Y. Lalatonne, I. Chebbi, M. Di Benedetto, J. M. Serfaty, M. Lecouvey, and L. Motte, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 10020–10027.
14. S. Brøgger Christensen, A. Andersen, H. Kromann, M. Treiman, B. Tombal, S. Denmeade, and J. T. Isaacs, *Bioorg. Med. Chem.*, 1999, **7**, 1273–1280.
15. C. M. Jakobsen, S. R. Denmeade, J. T. Isaacs, A. Gady, C. E. Olsen, and S. B. Christensen, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 4696–4703.
16. W. A. Denny, *Eur. J. Med. Chem.*, 2001, **36**, 577–595.

Conclusion générale et perspectives

Les nanovecteurs réalisés dans le cadre de cette étude sont élaborés à partir de nanoparticules d'oxyde de fer, dont les différentes étapes d'habillage sont modulées selon la fonctionnalité recherchée.

La principale application s'inscrit dans un contexte d'approche diagnostique pour laquelle les nanovecteurs sont destinés à l'administration par voie intraveineuse. Une deuxième application envisagée est l'utilisation de ces particules à visée théranostique.

Afin d'être utilisables lors de ces applications biomédicales, ces nanoparticules doivent être stables à pH physiologique, biocompatibles, et biodégradables. De plus, elles doivent être furtives et spécifiques du tissu ciblé. Pour cela, des ligands capables de reconnaître les récepteurs situés sur les cellules d'intérêt « équipent » les nanovecteurs, ce qui permet un ciblage actif en complément du ciblage passif induit par l'effet de perméabilité et de rétention tissulaire (EPR). Cibler le processus angiogénique, qui est une étape importante lors du développement des pathologies (cancer, athérosclérose, ischémie, ...), est apparu comme une stratégie intéressante. Ce processus implique l'intervention des intégrines $\alpha_v\beta_3$, qui se lient sélectivement aux peptides de type RGD. Dans le cadre de nos travaux, nous avons ainsi entrepris l'élaboration d'agents de contraste spécifiques de l'angiogenèse, ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$.

La conception du vecteur a été réalisée étape par étape et différentes techniques d'analyse ont été utilisées pour les caractériser au mieux. Des nanoparticules sphériques, de 9 nm de diamètre, ont été synthétisées par micelle directe, puis fonctionnalisées en surface par des agents complexants de type catéchol (acide caféique) ou bisphosphonate (HMBP-COOH ou HMBP-C \equiv CH), afin d'obtenir des ferrofluides stables à pH physiologique. Ces nanoplateformes présentent en surface des fonctions réactives qui peuvent être utilisées pour le couplage covalent de diverses molécules (fluorophore, chaînes PEG, peptides RGD).

Afin d'optimiser le couplage de ces diverses molécules nous avons joué sur différents paramètres : la stratégie de couplage, l'utilisation de l'énergie micro-ondes, l'augmentation du ratio ($n_{\text{molécules à coupler}} / n_{\text{fonctions réactives sur la nanoplateforme}}$). Deux stratégies ont ainsi été comparées : la chimie des carbodiimides et la chimie click (réaction de Huisgen et réaction thiol-yne). Nous avons remarqué que la chimie click présente de nombreux avantages (réaction à pH neutre, en une seule étape) et permet l'obtention de meilleurs taux de greffage quelle que soit la molécule considérée (fluorophore, chaînes PEG, RGD). De plus, il a été montré, lors du

couplage de fluorophores par chimie des carbodiimides ou par chimie click (réaction de Huisgen), que le couplage est fortement amélioré sous énergie micro-ondes. Cette voie a ainsi été privilégiée dans la suite de l'étude. L'augmentation du ratio joue également un rôle important sur l'obtention de meilleurs rendements excepté lors de la réaction thiol-yne.

Avec ces nanoparticules, nous avons montré qu'il était possible d'élaborer une nanoplateforme bimodale, présentant des propriétés d'agent de contraste pour l'imagerie à résonance magnétique (IRM), de part ses propriétés superparamagnétiques intrinsèques, et pour l'imagerie de fluorescence, par le couplage d'un fluorophore à la surface de la nanoparticule. Le couplage du peptide cyclique c(RGDfK) sur la nanoplateforme a permis le ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$, qui a été vérifié par résonance plasmonique de surface ou par dosage de liaisons sur support solide, en présence d'un ligand compétiteur radioactif. De plus, l'introduction de chaînes polyéthylène glycol a permis de servir d'espaceur entre la nanoplateforme et le peptide, permettant une optimisation du rendement de couplage et ainsi une amélioration de l'affinité vis-à-vis des intégrines. Il a été montré une stabilité de ces nanoplateformes dans le sérum (avec un relargage du fluorophore inférieur à 15% après 24h). De plus, le couplage de petites molécules a eu peu d'influence sur les valeurs de relaxivités r_2 , qui restent du même ordre de grandeur que la nanoplateforme de référence (de 130 à 190 $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$).

En vue d'améliorer l'affinité des nanoparticules vis-à-vis des intégrines, la conception et la synthèse chimique de peptidomimétiques a été réalisée. Cependant, ceux-ci n'ont pas donné les résultats escomptés puisqu'ils ont montré une affinité relativement faible en comparaison du peptide de référence. Ainsi l'amélioration de leur structure est à l'étude.

Afin d'optimiser les propriétés d'agents de contraste IRM, de nouvelles nanoparticules d'oxyde de fer ont été synthétisées : des nanoparticules sphériques de différentes tailles (3.7, 6 et 9 nm) obtenues par voie sol-gel sous micro-onde et des nanobâtonnets. Elles ont toutes été fonctionnalisées en surface par l'acide caféique et ont montré une stabilité à pH physiologique. L'influence de la taille, de la forme et de la méthode de synthèse sur les propriétés magnétiques a été étudiée. Une baisse de l'aimantation à saturation et de la relaxivité r_2 a été constatée en diminuant la taille des particules. Les nanoparticules de 3.7 nm ont ainsi montré un potentiel en tant qu'agent de contraste T1 sur un IRM clinique 1.5T. Les propriétés de surface et magnétiques des nanoparticules ont montré une dépendance vis-à-vis de la méthode de synthèse. Ainsi les nanoparticules obtenues par voie sol-gel montrent une plus faible réactivité de surface vis-à-vis de l'acide caféique mais un meilleur potentiel en tant qu'agent de contraste T2. En ce qui concerne les nanobâtonnets, ils présentent un important

ratio r_2/r_1 , cependant la faible aimantation à saturation obtenue est en faveur d'une quantité importante d'akaganéite dans la structure cristallographique. Des manipulations sont actuellement en cours afin de retransformer ces bâtonnets et d'augmenter le pourcentage en maghémite.

Les premières manipulations biologiques ont été effectuées. Les nanoparticules d'oxyde de fer obtenues par micelle directe et fonctionnalisées par l'acide caféique ont été utilisées lors de cette étude. Le potentiel de ciblage de ces nanoparticules, fonctionnalisées en surface par des peptides RGD, a été démontré *in vitro* sur des glioblastomes et sur des plaques d'athérome. Elles ont également permis le ciblage de tumeurs de carcinomes du colon, *in vivo*. Ceci a démontré leur potentiel en tant qu'agent de contraste IRM T2 pour le diagnostic de ce type de pathologies.

Cependant, lors de cette étude, l'effet EPR n'a pas été observé avec les nanoparticules non fonctionnalisées par le peptide. Ainsi, seul un ciblage actif a permis la détection des tumeurs. Afin d'améliorer la furtivité du système, la fonctionnalisation de surface avec de plus longues chaînes PEG a été considérée. L'expérience réalisée s'est montrée en faveur de cette hypothèse puisqu'elle a permis l'apparition d'hyposignaux dans la zone tumorale.

En parallèle, l'application de ces nanovecteurs pour le théranostic a été envisagée. Un dérivé de la thapsigargine, un agent cytotoxique, a été couplé, par la réaction de Huisgen, sur les nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par le bisphosphonate HMBP-C \equiv CH. Cependant, les études *in vitro* ont montré une faible cytotoxicité de cette nanoplateforme. Ainsi, une amélioration de la structure de la molécule a été proposée. Par ailleurs, l'utilisation de la stratégie « prodrug » est à considérer afin de limiter au maximum la cytotoxicité de la nanoplateforme aux cellules ciblées. Des manipulations complémentaires devront ainsi être réalisées avant d'arriver à une nanoplateforme au potentiel théranostique.

Ainsi, les travaux réalisés au cours de cette thèse n'en sont qu'à leurs prémices et de nombreuses optimisations peuvent être apportées. Afin d'améliorer le diagnostic, nous avons vu que l'utilisation de la double imagerie est un atout. Ainsi l'imagerie de fluorescence permettrait d'apporter la sensibilité manquante à l'imagerie IRM, qui possède une excellente résolution spatiale. Pour ce faire, il faudrait adapter le protocole de couplage établi à un fluorophore proche infrarouge.

Par ailleurs, au cours de ce travail, nous avons élaboré différentes nanoplateformes. Elles ont principalement été caractérisées dans l'eau à pH physiologique. Cependant, cette caractérisation ne tient pas compte de la complexité du milieu auquel va être soumis le

vecteur *in vivo*. Un travail approfondi *in vitro* serait nécessaire afin d'étudier leur comportement en milieu biologique. Nous pourrions ainsi évaluer l'effet du nombre de peptides, de la chaîne PEG, du ligand, de la fonction terminale, de la liaison entre le peptide,... L'affinité des nanoplateformes vis-à-vis des intégrines pourrait être estimée par cytométrie de flux en réalisant des tests de compétition en présence d'Echistatine-FITC sur des cellules surexprimant ces intégrines. Grâce à cette étude *in vitro*, nous pourrions ainsi désigner les candidats les plus adéquats pour le passage au modèle animal.

De plus, l'effet de la taille des nanoparticules, de la quantité ou de la longueur de PEG serait à analyser *in vivo* en vue d'optimiser le ciblage.

Un important travail reste également à faire pour comprendre et améliorer les propriétés des nanoparticules notamment au niveau de la relaxivité, paramètre clé lors du diagnostic IRM.

Dans l'ensemble, ce travail a apporté de nouveaux outils pour la vectorisation et a validé le potentiel d'une nanoplateforme pour imager par IRM l'angiogenèse tumorale. Une étude est actuellement en cours avec l'INSERM U698 (Dr V. Eder) pour étendre le potentiel de ciblage de ce nanovecteur à un autre modèle angiogénique, cette fois-ci induit par un processus ischémique. De plus, des molécules diverses de taille similaire au peptide pourraient être couplées afin d'explorer le ciblage d'autres récepteurs et ainsi élargir le domaine d'application.

Liste des publications et communications issues de ces travaux

Articles

Optimized multimodal nanoplatfrom for targeting $\alpha_v\beta_3$ integrins, J. Bolley, Y. Lalatonne, O. Haddad, D. Letourneur, M. Soussan, J. Perard-Viret, L. Motte, *Nanoscale*, 2013, 5 (23), 11478-89

Carbodiimide versus click chemistry for nanoparticle surface functionalization: a comparative study for the elaboration of multimodal superparamagnetic nanoparticles targeting $\alpha_v\beta_3$ integrins, J. Bolley, E. Guenin, N. Lievre, M. Lecouvey, M. Soussan, Y. Lalatonne, L. Motte, *Langmuir*, 2013, 29 (47), 14639-14647

Communications orales

ICNT, Paris, Juillet 2012, Iron oxide nanoparticles as MRI contrast agent for targeting integrin $\alpha_v\beta_3$ overexpressed by tumor cells. J. Bolley, V. Toum, N. Dupont, E. Guenin, Y. Lalatonne, M. Lecouvey, J.M. Serfaty, J. Royer, J. Perard-Viret, L. Motte

Journées jeunes chercheurs, Romainville, Février 2013, Multimodal Imaging Contrast Agent for optimizing affinity to integrin $\alpha_v\beta_3$, J. Bolley, E. Guenin, O. Haddad, Y. Lalatonne, L. Motte

Suprabio, Cassis, Juin 2013, CycloRGD Nanoplatfroms for MR Imaging cancer evaluation : key parameters to control nanoplatfrom design, J. Bolley, E. Guenin, O. Haddad, Y. Lalatonne, L. Motte

NN13, Thessalonique, Juillet 2013, Key parameters to control the design of CycloRGD multimodal Imaging contrast agent, J. Bolley, E. Guenin, O. Haddad, Y. Lalatonne, L. Motte

University College London, Londres, Juin 2013, Multimodal superparamagnetic nanoplatfrom for medical application, L. Motte, conference invitée

Séminaire Imagerie, Octobre 2013, Multimodal superparamagnetic nanoplatfrom for clinical applications, L. Motte, conférence invitée

4th Zing Bionanomaterials Conference, Malaga, Avril 2014, Iron oxide nanoparticles as MRI contrast agent for targeting integrin $\alpha_v\beta_3$ overexpressed by tumor cells, L. Motte, conference invitée

Posters

GTRV, Bruxelles, Décembre 2011, Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agent for targeting integrin $\alpha_v\beta_3$ overexpressed by tumor cells. J. Bolley, N. Dupont, E. Migianu, M. Monteil, M. Lecouvey, Y. Lalatonne, L. Motte, V. Toum, I. Zaabouli, J. Royer, J. Perard-Viret, M. Suzuki, J.M. Serfaty

PLIC, Nancy, Octobre 2012, CycloRGD Multimodal Imaging Contrast Agent . J. Bolley, E. Guenin, O. Haddad, Y. Lalatonne, L. Motte, *prix du meilleur poster*

GTRV, Chilly Mazarin, Décembre 2012, Multimodal superparamagnetic nanoplatform for targeting integrin $\alpha_v\beta_3$, J. Bolley, E. Guenin, O. Haddad, Y. Lalatonne, L. Motte

GTRV, Chilly Mazarin, Décembre 2012, Peptidomimetics of RGD bond to superparamagnetic nanoplatform for targeting integrin $\alpha_v\beta_3$, J. Perard-Viret, V. Toum, J. Bolley, Y. Lalatonne, M. Lecouvey, E. Guenin, L. Motte, N. Dupont

Journée Thématique Biomarqueurs, Caen, Décembre 2012, CycloRGD Multimodal Imaging Contrast Agent . J. Bolley, E. Guenin, O. Haddad, Y. Lalatonne, L. Motte

EMRS, Strasbourg, Mai 2013, CycloRGD Nanoplatfroms for dual Fluorescent / MR Imaging cancer evaluation : key parameters to control nanoplatform design. J. Bolley, E. Guenin, O. Haddad, Y. Lalatonne, L. Motte

TechConnect World, Washington, Mai 2013, Key parameters to control the design of CycloRGD multimodal Imaging contrast agent. J. Bolley, E. Guenin, O. Haddad, Y. Lalatonne, L. Motte

JCO, Palaiseau, Septembre 2013, RGD peptidomimetics bond to superparamagnetic nanoplatform for targeting integrin $\alpha_v\beta_3$, J. Perard-Viret, V. Toum, J. Bolley, M. Lecouvey, Y. Lalatonne, E. Guenin, L. Motte, N. Dupont

Annexes

Annexe 1

Les nanoparticules d'oxyde de fer

I. Principales méthodes de synthèse

La synthèse de particules magnétiques de taille contrôlée est d'un grand intérêt dans de multiples domaines. De nombreuses méthodes reposant sur la germination et la croissance des nanoparticules à partir de précurseurs, sont utilisées pour la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer.^{1,2}

La méthode de coprécipitation est la méthode la plus conventionnelle. Elle consiste à faire précipiter en phase aqueuse un mélange d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} par une base forte à température ambiante ou à des températures plus élevées. La taille des nanoparticules de magnétite ainsi formées (généralement de 2 à 15 nm) dépend du pH, de la force ionique, de la concentration des réactifs, de la méthode de mélange, ou de la température. Cette technique permet de synthétiser de grandes quantités de poudre mais présente l'inconvénient de former des nanoparticules assez polydisperses. Ainsi d'autres méthodes de synthèse permettant un meilleur contrôle de la distribution en taille ont été décrites. La méthode de décomposition thermique permet de former des nanoparticules les plus monodisperses (de taille inférieure à 20 nm) avec une distribution en taille très étroite. La décomposition des précurseurs métalliques ($\text{Fe}(\text{cup})_3$, $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ou $\text{Fe}(\text{CO})_5$) est réalisée dans un solvant organique en présence d'agents tensioactifs stabilisants (acide oléique, oleylamine) et nécessite des températures très élevées (250 à 300°C). Les réactifs utilisés sont des paramètres décisifs pour le contrôle de la taille et de la morphologie des particules.

D'autres méthodes sont également décrites dans la littérature: les microémulsions, la synthèse polyol, ou les méthodes sol-gel. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à deux de ces techniques alternatives : la synthèse par microémulsion et la synthèse sol-gel. La première consiste à former des micelles (directe ou inverse) comme précurseurs d'ions métalliques puis à les réduire en ajoutant une base faible. La formation de micelles directes de dodécylsulfate de fer II dans l'eau, puis l'ajout de la diméthylamine a été utilisée dans les chapitres 2 et 3 pour la formation des nanoparticules d'oxyde de fer de 9 nm. La température, la concentration du surfactant ou de la base contrôle la taille des particules. Au laboratoire, au cours de précédentes études, des nanoparticules de maghémite de 7 à 21 nm ont ainsi été obtenues en changeant la concentration en tensio-actif ou en augmentant la température.³

Pour les techniques sol-gel, Niederberger et Pinna⁴ distinguent deux procédés de synthèse des nanoparticules, l'un aqueux et l'autre non aqueux. La première étape d'une réaction sol-gel est la formation d'un polymère inorganique par des réactions d'hydrolyse et de condensation, c'est-à-dire la transformation du précurseur en un solide hautement réticulé. L'hydrolyse mène à un sol, une dispersion de particules colloïdales dans un liquide, puis la condensation résulte en un gel, un réseau inorganique interconnecté, rigide, et poreux. En milieu aqueux, la réactivité importante des précurseurs d'oxyde de métaux dans l'eau rend ces réactions rapides pouvant résulter en une perte de la morphologie ou de la structure. Les particules synthétisées sont généralement amorphes, ce qui nécessite une étape supplémentaire de recuit. Par ailleurs, un nombre important des paramètres de réactions doit être strictement contrôlé (pH, température, méthode de mélange, nature et concentration en ions) pour permettre une bonne reproductibilité. Les processus sol-gel non aqueux dans les solvants organiques sont capables de surmonter certaines de ces limitations. Les composants organiques jouent un rôle déterminant pour la taille et la forme des particules menant à la formation de nanoparticules de quelques nanomètres à la morphologie uniforme et cristallisée. Ces procédés non aqueux peuvent être divisés selon deux approches : l'un avec l'utilisation d'un surfactant ou l'autre sans.⁵ La synthèse contrôlée par le surfactant implique la transformation des précurseurs en présence de ligands stabilisateurs en utilisant des températures allant de 250 à 350 °C. L'autre alternative, plus simple, consiste à utiliser un solvant organique, qui agit aussi bien en tant que réactif, qu'en tant qu'agent contrôlant la croissance des particules. Les températures utilisées sont généralement plus basses, de l'ordre de 50 à 200°C. C'est cette dernière méthode qui sera utilisée pour la synthèse des nanoparticules sphériques de différentes tailles. (chapitre 4)

Lors de la préparation des nanoparticules inorganiques en phase liquide, la plupart des synthèses sont effectuées à l'aide d'une source de chaleur externe (bain d'huile, four). Ces techniques dépendent des courants de convection et souvent la température du récipient de la réaction est considérablement plus grande que celle du mélange réactionnel. L'utilisation des micro-ondes⁶ lors de ces synthèses permet d'éviter le contact direct entre la source de chaleur et les réactifs ou solvants, de contrôler efficacement les paramètres de réaction (ce qui est important aussi bien pour la qualité du produit que pour des questions de sécurité), de chauffer sélectivement (si le mélange réactionnel contient des composés qui diffèrent par leurs propriétés d'absorbance des micro-ondes), d'obtenir de hauts rendements et d'améliorer la reproductibilité.

II. Propriétés magnétiques

L'origine du magnétisme provient des ions métalliques porteurs de moments magnétiques (par exemple Fe^{3+} porteur de 5 magnétons de Bohr). Ainsi, dans certains matériaux, un ordre magnétique se développe. L'alignement de ces moments est parallèle dans le cas du ferromagnétisme (produisant une aimantation non nulle), antiparallèle avec compensation des moments dans le cas de l'antiferromagnétisme et sans compensation des moments dans le cas du ferrimagnétisme. L'ordre magnétique existe en dessous d'une température critique, dite de Curie (T_c pour les ferromagnétiques) ou de Néel (T_n pour les antiferromagnétiques ou ferrimagnétiques). Au dessus de cette température, l'ordre magnétique disparaît et les matériaux deviennent paramagnétiques.

Cet ordre résulte d'interactions d'échange alignant les moments magnétiques entre eux. L'énergie d'un matériau magnétique provient de la résultante de diverses contributions : l'énergie d'échange, qui tend à aligner les moments voisins, l'énergie d'anisotropie, qui tend à aligner les moments dans une direction particulière du matériau, l'énergie dipolaire entre particules et l'énergie de Zeeman, qui traduit l'interaction entre les moments et le champ magnétique externe. L'anisotropie magnétique résulte de différentes contributions : l'anisotropie magnéto-cristalline liée à la structure cristalline du matériau, l'anisotropie de forme (si la particule est non sphérique), l'anisotropie de surface causée par une rupture de symétrie à la surface et une réduction de la coordination des plus proches voisins ou l'anisotropie magnéto élastique.

Un matériau ferro- ou ferrimagnétique de dimension macroscopique se subdivise en domaines magnétiques appelés domaines de Weiss, séparés entre eux par des parois dites de « Bloch ». Chaque domaine possède un moment magnétique permanent. En dessous d'une certaine taille critique, la création de parois de Bloch (séparant les domaines magnétiques) devient non favorable et trop coûteuse en termes d'énergie, ainsi la structure de la particule devient monodomaine (diamètre critique de l'ordre de 30 nm pour la maghémite)⁷ maintenant un moment magnétique important. En absence de champ magnétique extérieur, l'aimantation de la particule est orientée parallèlement ou antiparallèlement à l'axe de facile aimantation, ces deux configurations étant séparées par une barrière d'énergie E_B . Le temps de relaxation de ce processus est donné par la relation de Néel-Brown :

$$\tau = \tau_0 \cdot \exp\left(\frac{E_B}{k_B \cdot T}\right) \quad (1)$$

Le préfacteur τ_0 est de l'ordre de 10^{-10} s. Le comportement observé dépend de la valeur de τ par rapport au temps caractéristique de mesure, τ_m . Si $\tau_m \ll \tau$, la relaxation n'est pas perçue et le comportement magnétique de la particule est analogue à celui du matériau massif, aux effets de surface près. En revanche si $\tau_m \gg \tau$, le moment de la particule relaxe dans les directions de facile aimantation plus vite que le temps de mesure et l'état magnétique apparaît comme désordonné. La température pour laquelle $\tau_m = \tau$ est appelée température de blocage (T_b , qui dépend de la taille de la nanoparticule, de l'anisotropie et de la méthode de mesure utilisée). Ainsi, au dessus de cette température, l'énergie thermique est suffisante pour introduire une rotation libre de la particule résultant à une perte de l'aimantation apparente en absence de champ magnétique externe. Cette propriété superparamagnétique, est marquée par l'absence d'une magnétisation rémanente à champ nul, permettant ainsi aux particules de maintenir une stabilité colloïdale et d'éviter l'agrégation, ce qui est intéressant pour les applications biomédicales.

Un nanomatériau superparamagnétique sera ainsi caractérisé à température ambiante par une courbe d'aimantation reproductible quel que soit le "chemin" en champ appliqué sur le matériau, sans ouverture de cycle (hysteresis) et il y a saturation au-delà d'une certaine valeur en champ appliqué H , Figure 1.

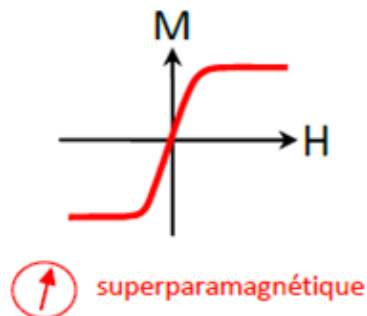


Figure 1 : Courbe d'aimantation et organisation schématique du moment magnétique d'un matériau superparamagnétique

III. Structures cristallines

En ce qui concerne la structure cristalline des oxydes de fer, il en existe deux à caractère superparamagnétique : la magnétite (Fe_3O_4) et sa forme oxydée, la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), Figure 2.

La magnétite Fe_3O_4 est une ferrite de structure cristalline dite spinelle inverse, où les ions ferreux Fe^{2+} et la moitié des ions ferriques Fe^{3+} occupent des sites octaédriques (site B) du réseau cubique faces centrées des atomes d'oxygène. L'autre moitié des ions ferriques

occupent les sites tétraédriques (sites A). La maille de la magnétite peut ainsi être décrite par la formule : $[\text{Fe}^{\text{III}}]_{\text{A}}[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}]_{\text{B}}\text{O}_4$. Le paramètre de maille de la magnétite vaut $a=0.8396$ nm. (fiche JCPDS 19-629).

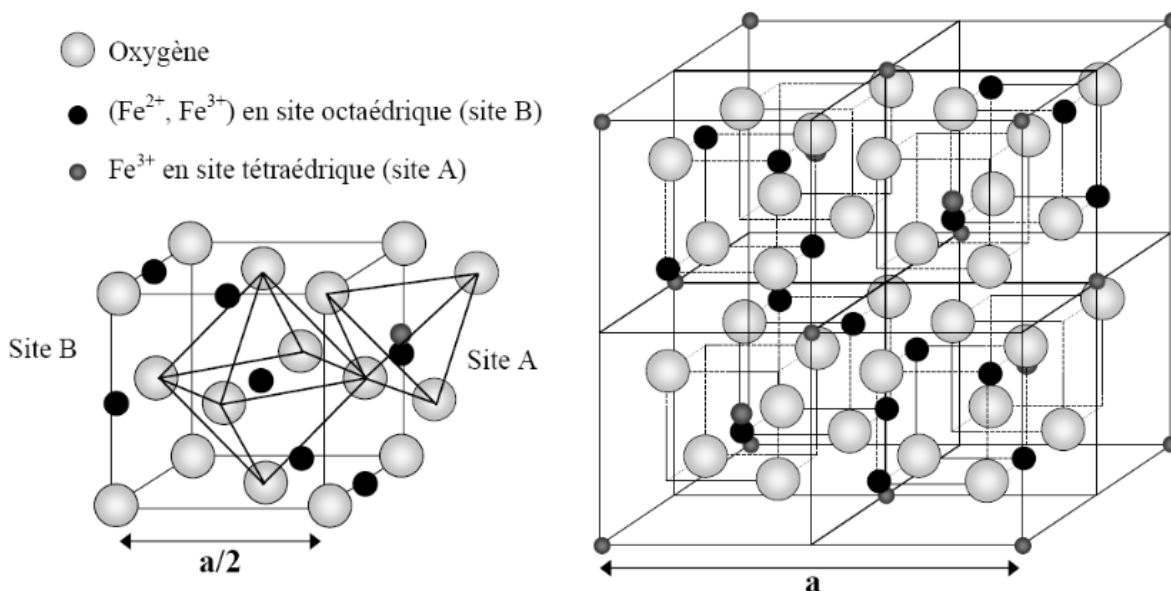


Figure 2 : Description de la structure d'une maille cristalline de la magnétite, d'après Mornet (Synthèse et modification chimique de surface de nanoparticules de maghémite à des fins d'applications biomédicales, Université de Bordeaux I, 2002)

Dans la maghémite, le fer se trouve entièrement à l'état trivalent. La structure est similaire à celle de la magnétite, excepté que les ions Fe^{2+} manquants sont remplacés par des lacunes, notées \square dans la formule de la maille $[\text{Fe}^{\text{III}}]_{\text{A}}[\text{Fe}^{\text{III}}_{5/3}\square_{1/3}]_{\text{B}}\text{O}_4$. Son paramètre de maille est proche de la magnétite, et vaut $a=0.8346$ nm (fiche JCPDS 39-1346).

De plus, au cours de ce travail, nous nous sommes également intéressés à une autre structure : l'akaganéite, qui compose en partie les nanobâtonnets que nous avons synthétisés. (chapitre 4) L'akaganéite est un oxyhydroxyde de fer III, de formule $\beta\text{-FeOOH}$, décrit comme matériau antiferromagnétique, qui possède une structure de symétrie monoclinique⁸, Figure 3A, dont les paramètres de maille sont : $a=1.0600$ nm, $b=0.30339$ nm, $c=1.0513$ nm et $\beta=90.24^\circ$.⁹ Les ions Fe^{3+} occupent deux sites octaédriques distincts. Cet enchainement d'octaèdres distordus liés deux à deux par leurs arêtes, constitue des feuillets et forme ainsi des canaux renfermant une quantité variable d'ions chlorures pouvant être échangés par d'autres ions.¹⁰

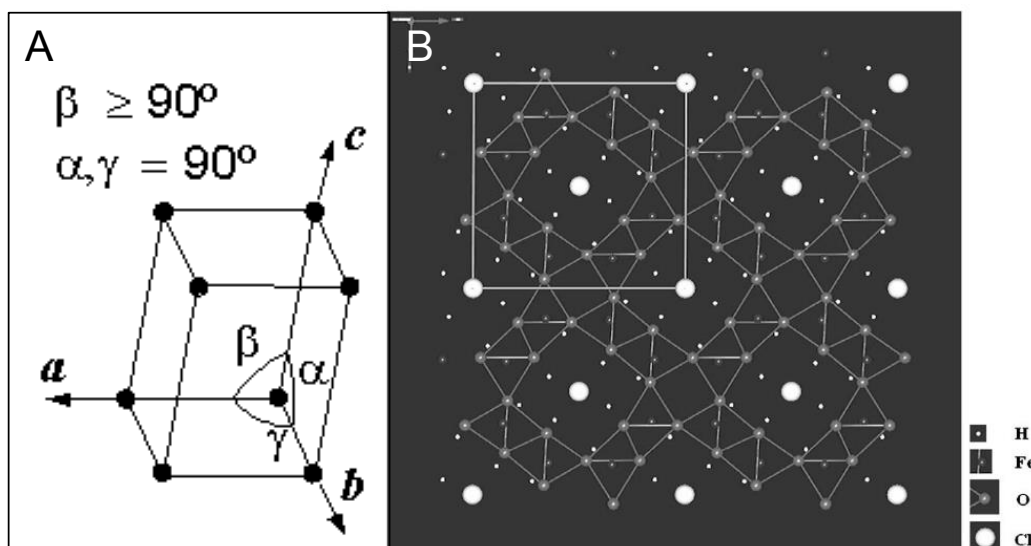


Figure 3 : (A) Système monoclinique et (B) Structure cristallographique de l'akaganéite¹⁰

Bibliographie

1. W. Wu, Q. He, and C. Jiang, *Nanoscale Res. Lett.*, 2008, **3**, 397–415.
2. P. Tartaj, M. del Puerto Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. González-Carreno, and C. J. Serna, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2003, **36**, R182.
3. C. de Montferrand, Y. Lalatonne, D. Bonnin, N. Lièvre, M. Lecouvey, P. Monod, V. Russier, and L. Motte, *Small*, 2012, **8**, 1945–1956.
4. M. Niederberger and N. Pinna, *Metal Oxide Nanoparticles in Organic Solvents: Synthesis, Formation, Assembly and Application*, Springer, 2009.
5. N. Pinna and M. Niederberger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 5292–5304.
6. I. Bilecka and M. Niederberger, *Nanoscale*, 2010, **2**, 1358–1374.
7. S. Bedanta and W. Kleemann, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2009, **42**, 013001.
8. R. M. Cornell and U. Schwertmann, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, John Wiley & Sons, 2003.
9. J. E. Post and V. F. Buchwald, *American Mineralogist*, 1991, **76**, 272–277.
10. S. Reguer, F. Mirambet, E. Dooryhee, J.-L. Hodeau, P. Dillmann, and P. Lagarde, *Corrosion Science*, 2009, **51**, 2795–2802.
11. F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. Williams, E. F. Meyer Jr, M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, and M. Tasumi, *J. Mol. Biol.*, 1977, **112**, 535–542.
12. J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, and M. A. Arnaout, *Science*, 2002, **296**, 151–155.

Annexe 2

Techniques de Caractérisations physico-chimiques et protocoles expérimentaux

I. Microscopie électronique à transmission

Les particules sont caractérisées en Microscopie à Transmission (MET) avec un microscope FEI CM10. Pour la préparation de l'échantillon, une goutte de particules en solution est déposée sur une grille (grille de cuivre recouverte d'un film mince de carbone amorphe) placée sur un papier filtre. Le diamètre des nanoparticules est déduit en simulant une fonction log-normale, équation 1 :

$$f(d) = \frac{1}{(2\pi)^{1/2} \sigma d} \exp \left[-\frac{1}{2\sigma^2} \left(\ln \frac{d}{d_0} \right)^2 \right] \quad (1)$$

où σ est la largeur de la distribution et $\ln(d_0)$ la moyenne de $\ln(d)$

L'écart type de la distribution des $\ln(d)$ σ est relié à l'écart-type de la distribution des diamètres w_0 par l'équation 2 :

$$\sigma = \sqrt{\ln \left(1 - \left(\sqrt{1 + 4 \cdot \left(\frac{w_0}{d_0} \right)^2} - \frac{1}{2} \right) \right)} \approx \sqrt{\ln \left(1 + \left(\frac{w_0}{d_0} \right)^2 \right)} \quad (2)$$

II. Diffusion de la lumière

La taille et le potentiel Zeta des nanoparticules ont été déterminés par diffusion de la lumière (DLS) sur un appareil Nano-ZS (Red Badge) ZEN 3600 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Les mesures sont effectuées en régime dilué (environ 0.3 mM en fer) afin de limiter les phénomènes d'agrégation liés aux interactions attractives entre nanocristaux.

La mesure du diamètre hydrodynamique correspond à la taille du volume de solvant déplacé par une nanoparticule en suspension, c'est-à-dire à la taille du cristal, plus l'épaisseur de son habillage, et l'épaisseur de la double couche ionique dite de Helmholtz ou de Stern, qui assure la répulsion entre deux particules, Figure 1A. La taille hydrodynamique peut être exprimée de trois manières (cf exemple, Figure 1B) :

- en intensité : dans ce cas, le poids d'une particule est lié à l'intensité de la lumière qu'elle diffuse (mesure brute)
- en volume : dans ce cas, les particules ont un poids lié à leur volume
- en nombre : dans ce cas, toutes les particules ont le même poids quelle que soit leur taille. C'est cette valeur que nous avons utilisé.

Le potentiel Zeta est le potentiel mesuré à la surface de la double couche ionique de la particule. Une stabilité colloïdale est obtenue pour une valeur absolue du potentiel Zeta supérieur à 30 mV. Le potentiel de charge nulle correspond au point isoélectrique, où les nanoparticules précipitent du fait de l'absence de répulsions électrostatiques.

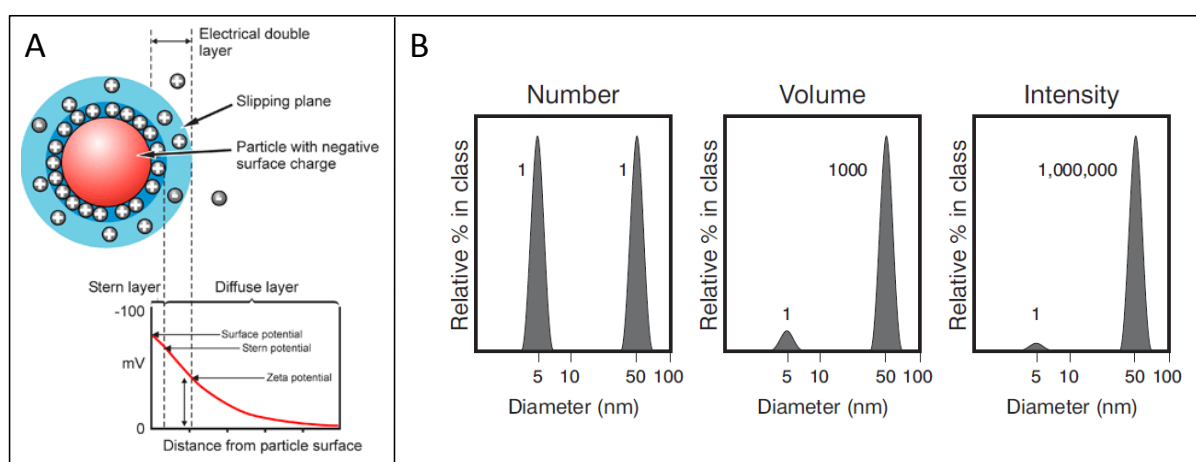


Figure 1 : (A) Taille hydrodynamique et potentiel de surface ; (B) distribution en nombre, en volume et en intensité d'une population bimodale de nanoparticules de 5 et 50 nm de diamètre, égale en nombre pour chaque population

III. Spectroscopie infrarouge

Les spectres infrarouges (IR) des ligands et des nanoplateformes ont été enregistrés sur un spectromètre Nicolet Thermo Scientific FTIR modèle 380 et sont reportés en fréquence d'absorption (cm^{-1}). Les échantillons sous forme de poudre ont été étudiés sous forme de pastilles KBr.

Les spectres infrarouges du cRGDfK avant et après micro-ondes ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Tensor 27 (Bruker, Karlsruhe, Allemagne), sous forme liquide, dans D_2O .

IV. Magnétomètre (VSM)

Le comportement magnétique des nanoparticules a été caractérisé en utilisant un VSM (Quantum Design, Versalab). Il mesure les cycles d'aimantation par application d'un champ de -2300 à +2300 kA/m avec une vitesse d'acquisition de l'ordre de 8 kA/s. Le principe de cet appareil repose sur une méthode de flux qui consiste à mesurer le flux induit dans un bobinage par déplacement périodique de l'échantillon. Plus précisément, l'échantillon est placé au centre d'un bobinage et est animé d'un mouvement de vibration avec une fréquence donnée et une amplitude constante. Les mesures sont réalisées sur un échantillon sous forme de poudre (environ 2 mg) ou sous forme de liquide à une température de 298 K (25°C).

Par ailleurs, les courbes ZFC/FC ont été mesurées à 100 Oe de 50 à 300 K. Pour cela, l'échantillon est placé à haute température à champ nul puis est refroidit jusqu'à 50 K sans application d'un champ magnétique (ZFC, Zero Field-cooled). Arrivé à basse température, un faible champ H de 100 Oe est appliqué. La température augmente alors progressivement et le moment magnétique est mesuré. Arrivé à 300 K, la température est abaissée jusqu'à 50 K en laissant le champ H (FC, Field-cooled) tout en mesurant le moment magnétique.

V. MIAplex®

Le MIAplex® est un appareil mis au point par la société Magnisense qui permet de mesurer un signal proportionnel à la dérivée seconde de la courbe d'aimantation au voisinage du champ nul, Figure 2. Le cycle d'aimantation est enregistré sur une gamme de champ étroite, de -15 à 15 kA/m. La mesure s'effectue sur 10 μ L de ferrofluide à température ambiante.

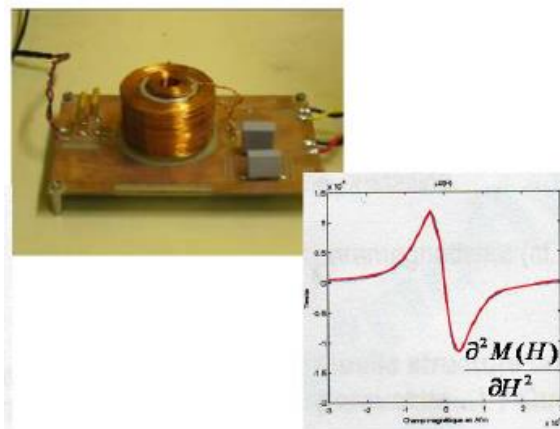


Figure 2 : Représentation du MIAplex(R) et de la dérivée seconde de la courbe d'aimantation

VI. Imagerie à Résonance Magnétique

L'IRM est une technique d'imagerie médicale récente (début des années 80), non invasive basée sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire. En effet, certains atomes (par exemple ^1H , ^{13}C , ^{31}P ...) dont le noyau est constitué d'un nombre impair de nucléons (protons et neutrons), possèdent un moment magnétique non nul caractérisé par une grandeur quantique, le spin nucléaire. Le spin le plus étudié en IRM est celui du proton, puisque l'hydrogène est très abondant dans les tissus biologiques. Sous l'effet d'un champ magnétique statique B_0 , les moments magnétiques du spin vont progressivement s'aligner dans une direction parallèle à celui-ci, donnant lieu à une aimantation globale dans sa direction. Lorsque l'on applique l'onde magnétique radiofréquence oscillante B_1 à la fréquence de résonance de Larmor, les moments magnétiques vont se placer dans un plan perpendiculaire à la direction du champ statique B_0 . C'est ce qu'on appelle l'excitation. Lorsque le champ oscillant est interrompu, les moments magnétiques vont revenir dans leur position initiale. Ce mouvement de rotation sous la forme d'un signal oscillant qui a la même fréquence que l'onde excitatrice, est mesuré en IRM au moyen d'une antenne réceptrice. Le temps que mettent les moments magnétiques nucléaires à retrouver leur alignement longitudinal est noté T_1 alors que le temps T_2 mesure la disparition de l'aimantation transversale, Figure . Afin d'augmenter le signal produit des agents de contraste sont utilisés.

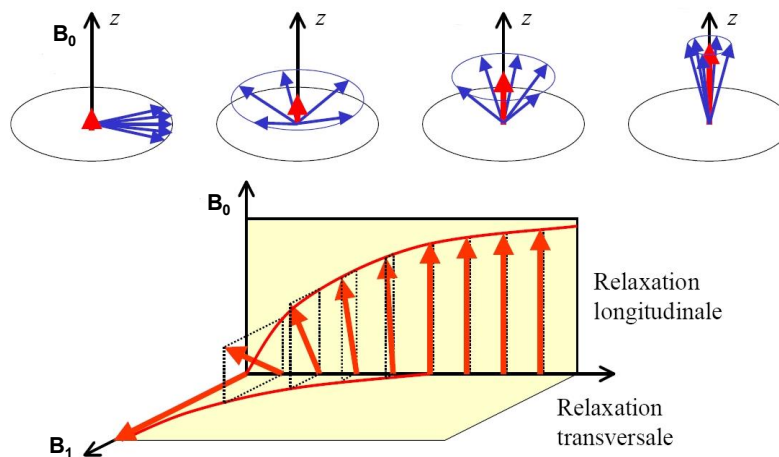


Figure 3 : Représentation schématique des temps de relaxation longitudinale (T_1) et transversale (T_2)

Des mesures de temps de relaxation T_1 et T_2 ont été effectuées sur un IRM clinique 1.5 T (Philips intera 1.5T / Philips healthcare) à température ambiante, sur une gamme de concentration allant de 0.061 mM à 0.25 mM en fer.

Pour la mesure T_2 , la séquence écho de spin a été utilisée et consiste à appliquer au bout d'un certain temps $TE/2$ après l'impulsion de 90° , une impulsion de 180° . Cette dernière a pour but

d'inverser tous les déphasages, ainsi les protons les plus rapides et donc les plus déphasés vont se retrouver les moins déphasés mais garderont la même vitesse. Au bout du temps d'écho (TE) les protons seront de nouveau tous en phase ou presque, engendrant un signal d'écho de spin. Cet enchaînement est répété à chaque intervalle de temps TR (temps de répétition), Figure 4. Les acquisitions T2 ont ainsi été réalisées avec un temps de répétition de 2000 ms et des temps d'écho de 20, 40, 60 et 80 ms

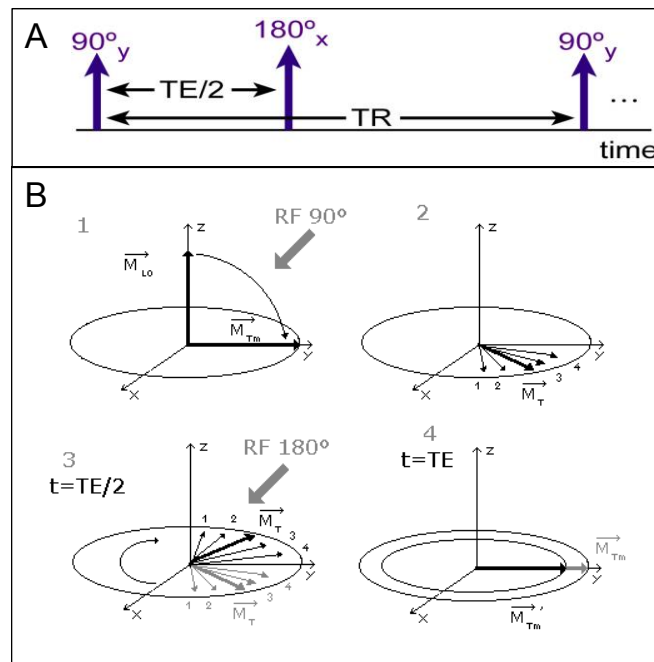


Figure 4 : (A) Séquence IRM d'écho de spin - (B) Représentation schématique des protons après l'impulsion à 90° et à 180°

Pour les mesures T1, une séquence inversion-récupération a été utilisée. Elle a pour base une séquence écho de spin. Une impulsion de 180° a été ajoutée avant l'impulsion de 90° , qui marque le début de la séquence d'écho de spin, ce qui permet une meilleure différenciation des tissus en fonction de leur T1, Figure 5. Ceci s'explique par le fait que l'aimantation longitudinale décrit un trajet deux fois plus long. Ainsi, les acquisitions T1 ont été réalisées avec un temps de répétition de 2000 ms, un temps d'écho de 16 ms et des temps d'inversion croissants de 50, 100, 200, 300, 450, 600, 750, 900, 1100, 1500 et 1800 ms.

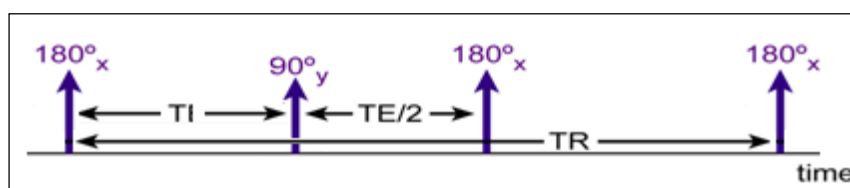


Figure 5 : Séquence IRM inversion-récupération

VII. Analyse Thermogravimétrique

L'analyse thermogravimétrique (ATG) a été réalisée à l'aide d'un appareil LabsSys evo TG-DTA-DSC 16000 (Setaram Instrumentation). Elle permet de mesurer la masse d'un échantillon soumis à une variation linéaire de température. L'analyse est réalisée dans un creuset sur une masse d'échantillon connue, sous forme de poudre, supérieure à une dizaine de milligrammes, sous un flux d'air. L'enregistrement de la perte de poids de l'échantillon permet ainsi d'accéder au nombre de ligands adsorbés selon l'équation 3 :

$$\boxed{Ligands/nano = \frac{n_{ligand}}{n_{nano}} = \frac{m_{ligand} \cdot M_{nano}}{m_{nano} \cdot M_{ligand}} = \frac{\Delta m(\%) \cdot M_{nano}}{(1 - \Delta m(\%) - \Delta m_{eau}(\%)) \cdot M_{ligand}}} \quad (3)$$

$$\text{Avec : } M_{nano} = \rho_{nano} \cdot V_{nano} \cdot N_A = \rho_{nano} \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot R^3 \cdot N_A \quad \text{et} \quad \begin{aligned} \rho_{nano} &= 5.2 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3} \\ R &= 4.5 \text{ nm} \\ N_A &= 6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} \end{aligned}$$

VIII. Spectroscopie UV

Les spectres UV-visible ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Varian Cary 50 Scan.

IX. Analyse EDX

L'analyse EDX a été réalisée sur un microscope TM 3000 table top, équipé d'un système de microanalyse Swift EDX-ray 3000 (Oxford Instruments). Les échantillons, sous forme de poudre, ont été déposés sur une surface de cuivre et les données ont été collectées en utilisant un voltage de 15kA.

Cette méthode permet de connaître la composition élémentaire d'un échantillon par la mesure des énergies de photons X émis par la région de l'échantillon bombardée par le faisceau d'électrons. Peu de quantité de produit est nécessaire contrairement à l'ATG, cependant la quantification des éléments légers tels que le carbone, l'oxygène et l'azote est incertaine. Cette dernière technique a pu être utilisée pour connaître le nombre de bisphosphonates adsorbés ou pour quantifier le nombre de PEG couplés par thiol-yne (chapitre 3).

En effet, le nombre d'atomes de fer par nanoparticule de maghémite de 9 nm étant connu, le pourcentage atomique de fer et de phosphore, déduits de la mesure EDX permettent de remonter au nombre de bisphosphonates par nanoparticule selon la relation 4 :

$$\text{Nombre Atomes Fer / nano} = \frac{M_{\text{nano}}}{M_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3}} \cdot 2 \approx \frac{1.2 \cdot 10^6}{160} \cdot 2 \approx 15000$$

$$\boxed{\text{Bisphosphonates / nano} = 15000 \cdot \frac{\% \text{ atomique (P)}}{\% \text{ atomique (Fe)}} \cdot \frac{1}{2}} \quad (4)$$

Par ailleurs, le rapport atomique Soufre/Fer permet de déterminer le nombre de HS-PEG₄-COOH par nanoparticule. Un exemple de spectre EDX d'une nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-C}\equiv\text{CH}$ PEGylée (R=5 1h30) est présenté Figure 6. Pour des nanoparticules de 9 nm de diamètre, le nombre de PEG par nanoparticule est calculé selon l'équation 4 :

$$\boxed{\text{PEG / nano} = 15000 \cdot \frac{\% \text{ atomique (S)}}{\% \text{ atomique (Fe)}}} \quad (4)$$

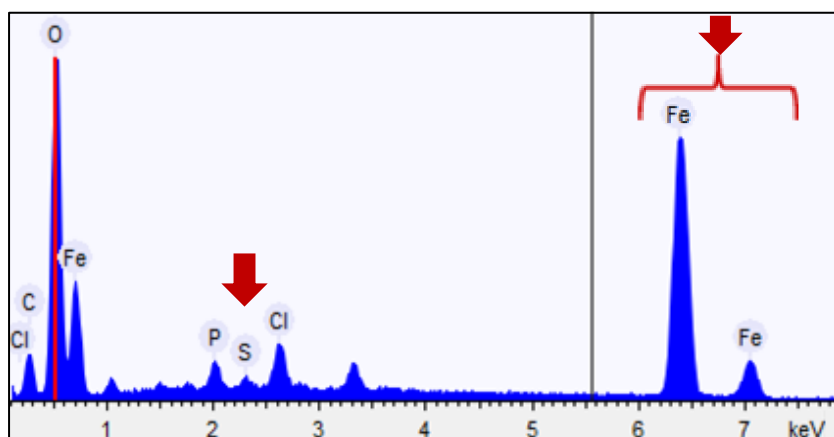


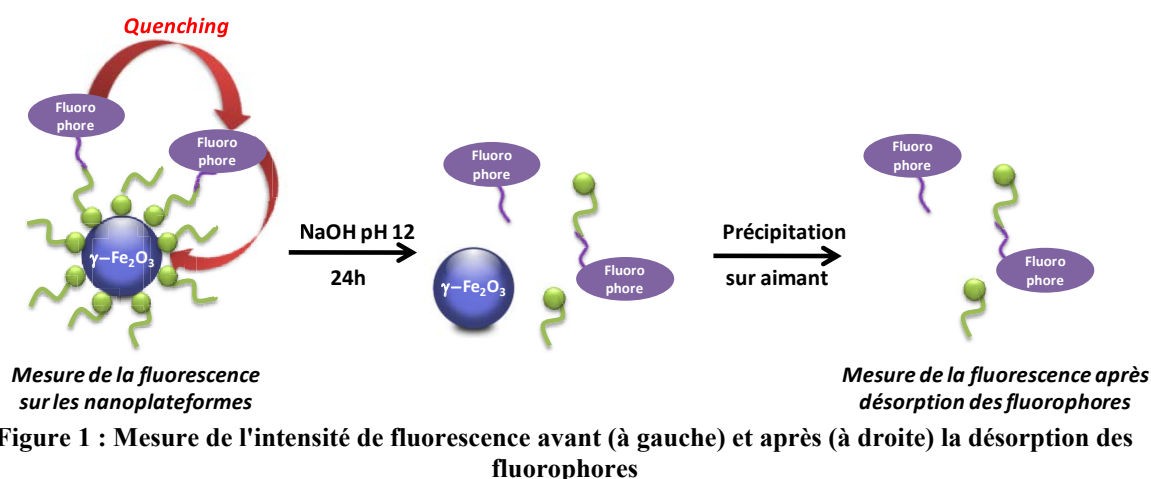
Figure 6 : Exemple de spectre EDX d'une nanoplateforme $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{HMBP-C}\equiv\text{CH}$ PEGylée (R=5 30min)

Annexe 3

Techniques de dosages et protocoles expérimentaux

I. Dosage de fluorophores

Les mesures de fluorescence ont été effectuées sur un spectrofluorimètre Spex FluoroMax (HORIBA Jobin-Yvon, France) équipé d'un photomultiplicateur Hamamatsu 928. Afin de quantifier le nombre de fluorophores et le quenching sur les nanoplateformes, l'intensité de fluorescence est mesurée sur les nanoplateformes fluorescentes et comparée à celle des molécules de Rhodamine désorbées de la surface, Figure 1.



Pour cela, les solutions de nanoparticules sont laissées à pH 12 sous agitation pendant 24 heures. Les fonctions hydroxyles de la base, en large excès, peuvent se substituer aux molécules de Rhodamine car leur nucléophilie est plus importante. Il est aussi envisagé que ce soit le complexe ligand/Rhodamine qui se décroche. Les nanoparticules magnétiques sont ensuite séparées du surnageant fluorescent grâce à un aimant. Les fluorophores libres sont dosés par spectrométrie de fluorescence en utilisant des courbes d'étalonnage, réalisées sur des solutions de Rhodamine (R123 ou RN₃) à concentration croissante, Figure 2. De cette manière, le nombre de fluorophores par nanoparticules avant et après désorption est déduit, et le rapport permet de mettre en évidence le quenching sur les nanoplateformes.

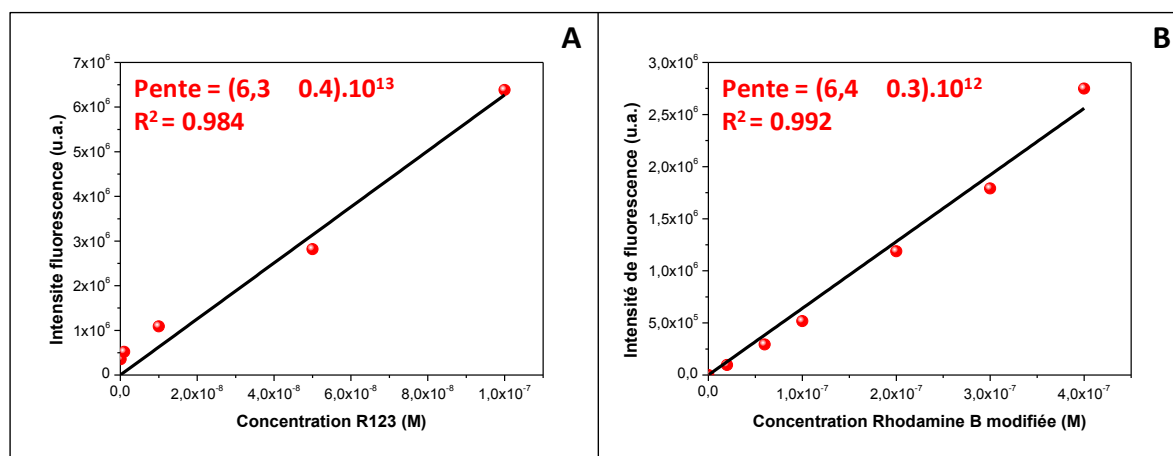


Figure 2: Droites d'étalonnage des solutions de Rhodamine 123 (à gauche) et de Rhodamine B modifiée (RN₃) (à droite)

II. Dosage des fonctions amines

Afin de quantifier le nombre de H₂N-PEG-COOH et le nombre de peptides cRGD ou mimes par nanoparticule, nous avons réalisé un dosage des fonctions amines à l'aide du réactif fluoraldéhyde (OPA). 50 µL d'une solution de nanoparticules ont été mélangées avec 50 µL de NaOH 2N pendant une nuit à 60°C. Les nanoparticules magnétiques sont ensuite séparées du surnageant grâce à un aimant. 1 mL de réactif fluoraldéhyde est ajouté au surnageant. Après 1 min de réaction, la fluorescence est mesurée. Une courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions sur des solutions de molécules libres (PEG, cRGD, ou mimes), à concentration croissante, Figure 3.

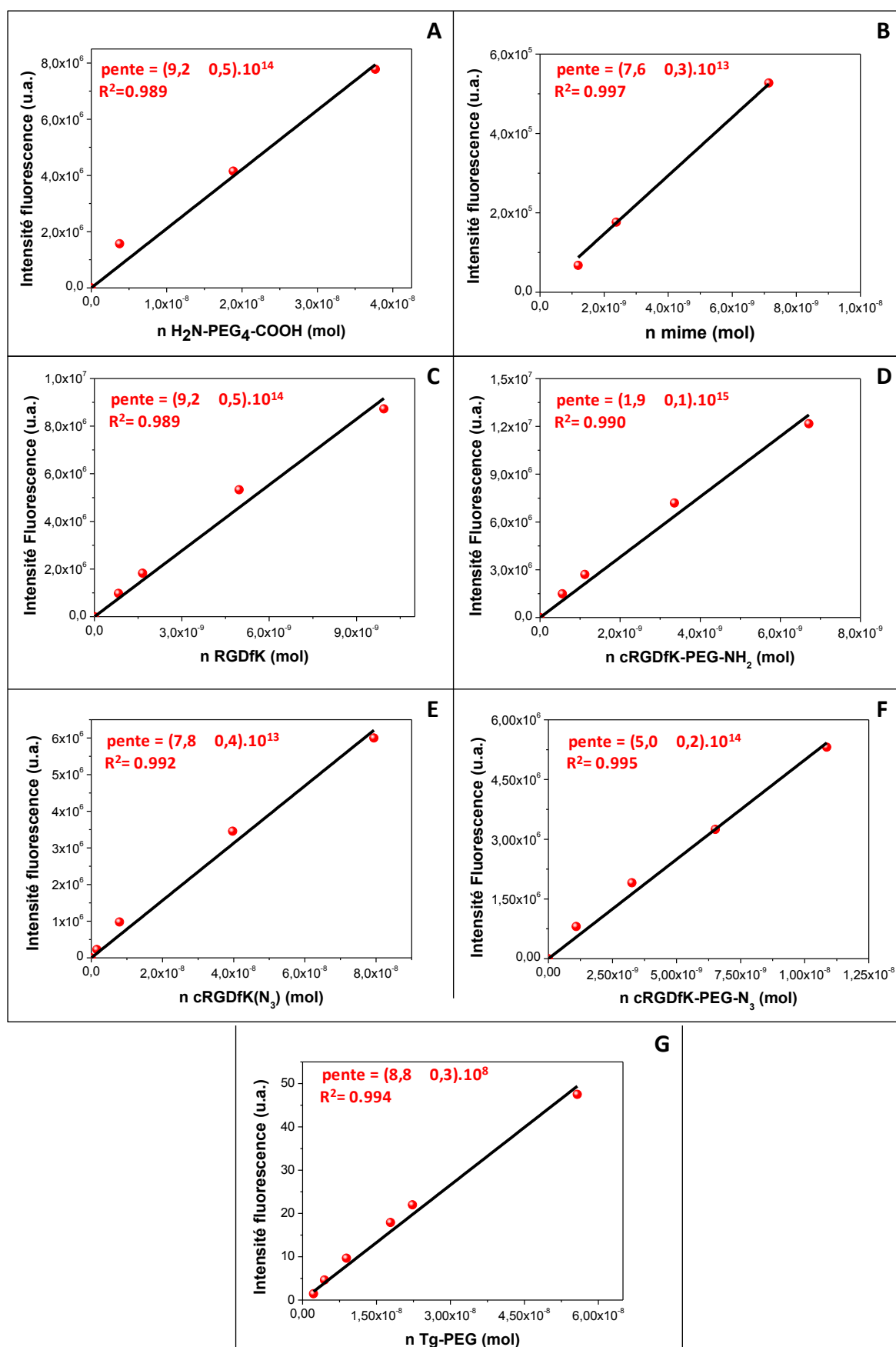


Figure 3 : Droites d'étalonnage des diverses molécules à concentration croissante quantifiables par la méthode OPA : (A) $\text{H}_2\text{N-PEG}_4\text{-COOH}$, (B) mime, et dérivés cRGD : (C) cRGDfK, (D) cRGDfK-PEG-NH₂, (E) cRGDfK(N₃), (F) cRGDfK-PEG-N₃, (G) Tg-PEG

III. Dosages par BIAcore

Le BIAcore est un outil permettant non seulement de visualiser en temps réel les interactions entre biomolécules mais également de quantifier cette force d'interaction (affinité, constantes de vitesse, quantités de ligand et d'analyte immobilisés). Cette technique basée sur la résonance plasmonique de surface mesure les changements d'indice, de masse à proximité de la surface métallique d'étude, Figure 4. En effet, lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique illumine une interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents (dans notre cas, le verre de la surface du capteur d'indice de réfraction élevé, et le milieu liquide d'indice de réfraction faible), une partie de la lumière incidente est réfléchiée et l'autre partie est réfractée. Selon l'angle d'incidence, toute la lumière peut être réfléchiée et une composante électromagnétique de la lumière, l'onde évanescente se propage perpendiculairement à l'interface. Le faisceau incident étant riche en photons, ces derniers peuvent entrer en résonance avec les électrons libres de la couche du métal (l'or). Cet angle de résonance, varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu qui change en fonction de la masse de molécules situées au voisinage de la surface, ce qui permet de suivre en temps réel l'association entre le ligand et l'analyte. Le signal obtenu est enregistré sous forme d'un sensorgramme et quantifié en unités de résonance (RU). Cette technologie a débouché sur une instrumentation commercialisée sur le nom de BIAcore.

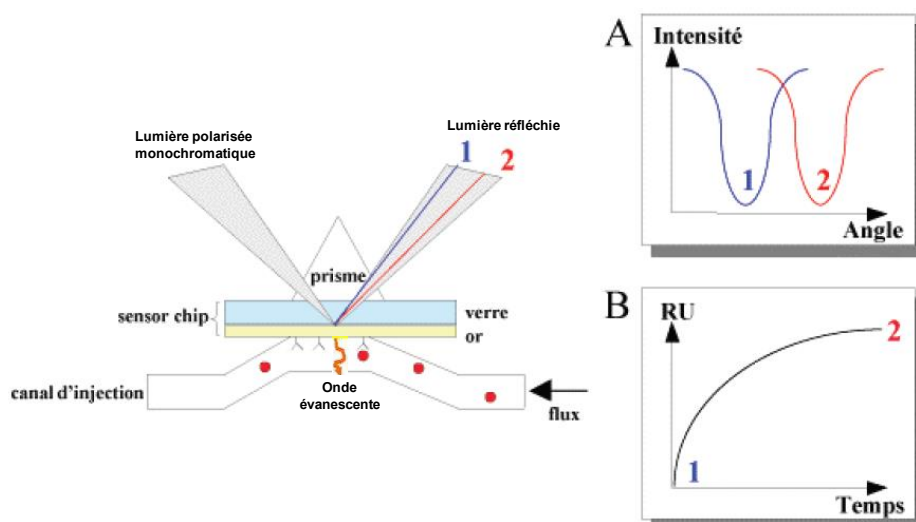


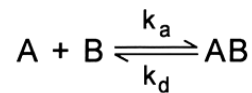
Figure 4 : Principe de détection du BIAcore – (A) courbe de plasmons ; (B) sensorgramme en fonction du temps

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé un appareil BIAcore X100 (GE healthcare) et une puce CM5, surface d'or recouverte de carboxyméthyl-dextran (CMD).

Le protocole standard qui consiste à coupler sur la piste de mesure de manière covalente, via la fonction amine, l'intégrine $\alpha\beta3$ est décrit ci-après. La piste est activée avec un mélange EDC/NHS, puis les intégrines sont injectées à une concentration de 0.1 mg/mL diluées dans du tampon acétate (10 mM, pH 4 avec 1mM Mn^{2+} , 1 mM Mg^{2+} , 2mM Ca^{2+}). Une solution d'éthanolamine (1M, pH 8.5) est ensuite mise en contact avec la surface afin de bloquer les sites activés par la première étape qui n'auraient pas réagit.

Cette procédure standard a été modifiée pour réaliser une cinétique, et ainsi déterminer la constante d'affinité de la nanoplateforme $\gamma Fe_2O_3@CA-(cRGD)$ (R=2) vis-à-vis des intégrines. Pour cela, les nanoparticules $\gamma Fe_2O_3@CA$ et $\gamma Fe_2O_3@CA-(cRGD)$ ont été immobilisées respectivement sur la piste de référence et sur la piste de mesure sans activation préalable. Par la suite, des concentrations croissantes d'intégrines (1.23, 3.7, 11.1 et 33 nM), diluées dans du tampon acétate (10 mM, pH 4 avec 1mM Mn^{2+} , 1 mM Mg^{2+} , 2mM Ca^{2+}), sont injectées. L'évolution du signal RU en fonction de la concentration permet d'accéder à la valeur de la constante d'affinité en utilisant le modèle « steady-state ».

Ce modèle considère une interaction entre le ligand de surface (B) et l'analyte en solution (A) conduisant à la formation du complexe AB selon le schéma réactionnel suivant :



où k_a (en $M^{-1}.s^{-1}$) et k_d (en s^{-1}) sont respectivement les constantes de vitesse d'association et de dissociation du complexe.

L'équation de vitesse, exprimée en termes de réponse SPR (R), s'écrit :

$$\begin{aligned} \frac{d[AB]}{dt} &= k_a \cdot [A]_{libre} \cdot [B]_{libre} - k_d \cdot [AB] \\ \frac{dR}{dt} &= k_a \cdot C_{libre} \cdot (R_{max} - R) - k_d \cdot R \end{aligned}$$

Lorsque l'équilibre est atteint, Figure 5A, la concentration du complexe est directement proportionnelle à la réponse R_{eq} et la concentration de l'analyte est la concentration injectée C. L'équation devient :

$$\frac{dR}{dt} = k_a \cdot C \cdot (R_{max} - R_{eq}) - k_d \cdot R_{eq} = 0$$

$$R_{eq} = \frac{k_a \cdot C \cdot R_{max}}{k_d + k_a \cdot C}$$

Après réarrangement, la constante K_d peut être déduite de l'équation :

$$K_d = \frac{k_d}{k_a} = \frac{C \cdot (R_{max} - R_{eq})}{R_{eq}}$$

Pour une valeur particulière, c'est-à-dire pour $R_{eq} = 50\% R_{max}$, la valeur de la constante K_d est directement égale à la valeur de la concentration d'analyte injectée. Ainsi en traçant la courbe, R_{eq} en fonction de C , la constante K_d peut être déduite de cette courbe, Figure 5B.

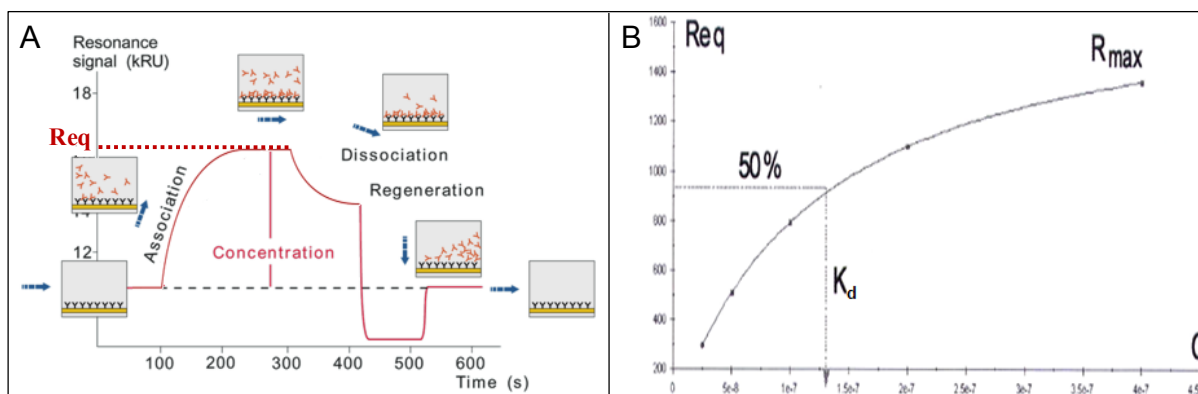


Figure 5 : (A) Détermination du R_{eq} sur le sensorgramme ; (B) Détermination de la constante K_d à partir de la courbe R_{eq} en fonction de C et du modèle « steady state »

IV. Dosages de liaisons sur support solide

Cette technique permet de définir l'affinité d'un nouveau ligand sur des sites de liaisons spécifiques (récepteurs). Il existe deux types de méthodes : la méthode de saturation et la méthode de déplacement (ou compétition). La première a été utilisée pour déterminer la valeur de la constante K_d de l'Echistatine, et la seconde pour déterminer l'affinité de divers ligands non radiomarqués.

Le dosage de liaisons sur support solide a été réalisé selon une procédure décrite par Orlando et Cheresch, 1991. Les intégrines $\alpha v \beta 3$ sont diluées à 500 ng/mL dans une solution tampon de fixation (20 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 2mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$). Un aliquot de 100 μ L est déposé dans chaque puit d'une plaque Microlite2+ (Thermoscientific). Après incubation à 4°C pendant une nuit, un lavage est effectué avec la solution tampon de

blocage/liaison (20 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 2mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1% BSA) suivi d'une incubation pendant 2 h à température ambiante et de 2 lavages. Pour la détermination de la constante d'affinité de l'échistatine, l'¹²⁵I-Echistatine a été ajoutée à différentes concentrations (0.05, 0.1, 0.25, 0.75, 1.25, 2.5 nM). Pour les co-incubations, le ligand est ajouté à des concentrations variables (de 10⁻⁴ à 10⁻¹¹ pour les peptides ou mimes et de 10⁻⁷ à 10⁻¹⁴ pour les nanoplateformes) suivi par le compétiteur radioactif, ¹²⁵I-Echistatine (Perkin Elmer), à une concentration constante de 0.05 nM. Après 3 heures d'incubation, 3 lavages permettent d'éliminer les molécules non fixées par l'intégrine. Une dernière étape consiste à la solubilisation des molécules liées (NaOH 2M) avant de procéder à la mesure radioactive sur un appareil Wizard 1470 (Perkin Elmer). Aucun signal n'a été détecté lorsque la molécule radioactive est incubée sans récepteur, montrant la non-spécifique adsorption de celle-ci avec la plaque.

La méthode de saturation permet, à partir d'un ligand radiomarké, de définir une liaison dite totale, qui correspond à la somme de la liaison du ligand à son récepteur (liaison spécifique à forte affinité) et à d'autres sites de liaison à faible affinité (liaison non spécifique). La liaison non spécifique est mesurée en présence d'une quantité de ligand non radioactif suffisante pour empêcher la fixation du ligand radioactif sur ces sites spécifiques. La liaison spécifique correspond à la différence entre la liaison totale et la liaison non spécifique et permet de définir l'affinité du ligand pour son récepteur. Les liaisons non spécifiques de la molécule radioactive sur le récepteur ont ainsi été déterminées avec un excès molaire (200 fois) d'Echistatine non radiomarkée. La Figure 6A montre l'isotherme de saturation de l'¹²⁵I-echistatine vis-à-vis des intégrines et les liaisons non spécifiques, qui s'avèrent négligeables. A partir de cette expérience de saturation, il est possible de déterminer la constante K_d, traduisant l'affinité du ligand pour son récepteur. Plus celle-ci est faible plus l'affinité du ligand pour le récepteur est élevée. Cette constante est obtenue à partir d'une transformation des données de la courbe de saturation, transformation dite de Scatchard, qui représente la relation entre la quantité de ligand fixé de façon spécifique et le rapport radioligand fixé sur radioligand libre, Figure 6B. L'inverse de la valeur absolue de la pente permet de déterminer une valeur de K_d de 0.22 nM.

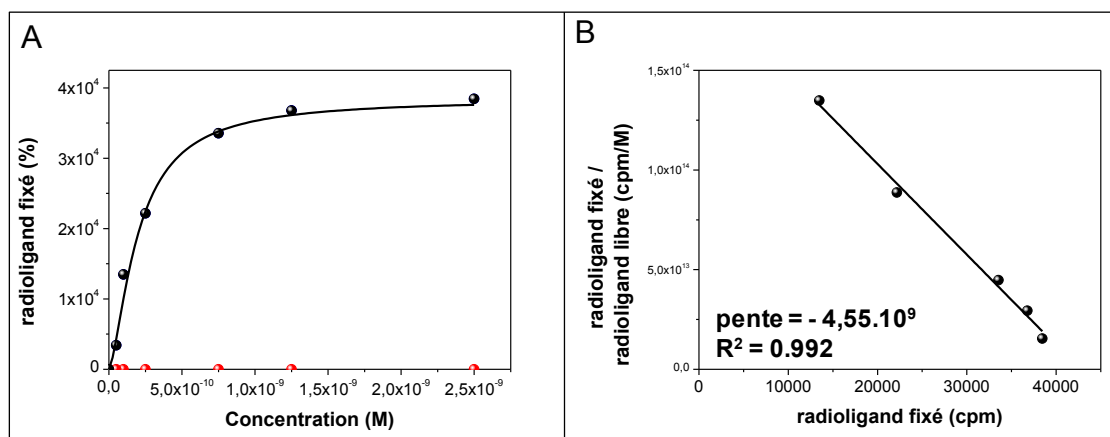


Figure 6 : (A) Isotherme de saturation de ¹²⁵I-echistatine vis-à-vis des intégrines (noir) et liaisons non spécifiques en présence d'un excès d'echistatine non radioactive (200 fois) (rouge) ; (B) Détermination de la constante d'affinité de ¹²⁵I-echistatine à partir de l'analyse de Scatchard

Les expériences de compétition permettent de déterminer l'affinité d'un ligand non radioactif. Elles sont réalisées en présence d'une concentration fixe de ligand radioactif (0.05 nM pour l'¹²⁵I-echistatine) et de concentrations croissantes de ligand non radioactif à étudier (de 10⁻⁴ à 10⁻¹¹ pour les peptides ou mimes et de 10⁻⁷ à 10⁻¹⁴ pour les nanoplateformes). Elles permettent de déterminer l'IC₅₀ et la constante d'inhibition K_i. L'IC₅₀ correspond à la concentration de ligand non radioactif nécessaire pour déplacer 50 % de la fixation totale du ligand radioactif, Figure 7. La constante d'inhibition est ensuite déduite de l'équation suivante :

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{L^*}{K_d}}$$

Avec K_i la constante d'affinité

K_d la constante d'affinité de l'Echistatine (0.22 nM)

L* la concentration d'¹²⁵I-Echistatine dans le puit (0.05 nM)

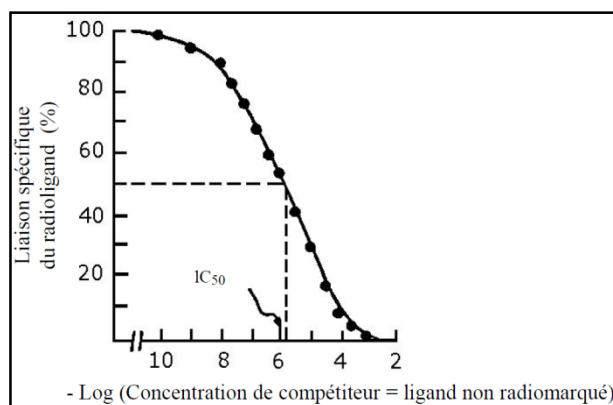


Figure 7 : Détermination de l'IC₅₀ lors des expériences de compétition

Annexe 4

Design des peptidomimétiques et estimation *in silico* de leurs affinités vis-à-vis de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par docking moléculaire en référence au cycloRGD

I. Généralités sur le docking moléculaire

Le docking moléculaire est un moyen *in silico* d'étude et de simulation de l'ensemble des mécanismes et interactions intervenant lors de la formation de complexes moléculaires. Il est au centre d'applications pratiques comme l'ingénierie des protéines et la conception de médicaments. Il a ainsi déjà aidé à la conception de nouveaux ligands pour des agents anti-sida et anti-cancer, et pour le traitement des diabètes.

Les programmes de docking moléculaire orientés structure sont basés sur l'hypothèse que les ligands formant des interactions favorables avec le récepteur doivent avoir une affinité de liaison élevée. Ils reposent sur l'exploration systématique de l'espace des configurations pour générer et évaluer un grand nombre de liaisons potentielles.

On parle de conception rationnelle de ligands ou de conception « structure – based » quand le point de départ de la réflexion est la connaissance de la structure du site actif de la protéine cible ou encore mieux d'un complexe protéine - ligand.

II. Le logiciel CCDC GOLD

Le logiciel CCDC GOLD version 5.2 a été utilisé pour l'exécution de ce travail. GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking) utilise un processus d'algorithme génétique pour générer les conformations multiples permettant le docking de ligands flexibles dans les sites de liaison des protéines hôtes. Il permet de réaliser le docking de ligands potentiels au sein des sites actifs à partir de fichiers préalablement préparés.

D'une part, le fichier récupéré sur le site de la PDB (Protein Data Bank) doit être tout d'abord complété par l'ajout des atomes d'hydrogènes manquants et la correction des états d'ionisation. Les molécules d'eau non importantes pour l'établissement de l'interaction, quand il y en a, ainsi que le ligand doivent ensuite être extraits.

D'autre part, le site actif est défini, soit en spécifiant son centre approximatif et en considérant tous les atomes de la protéine cible situés dans un rayon défini à partir de ce centre, soit sur la

base du volume du ligand extrait augmenté d'un rayon défini. Seuls les atomes inclus dans ce site actif sont considérés pendant le calcul.

Les fichiers des ligands à docker font l'objet d'une préparation avec un état de protonation correspondant au pH pour lequel le complexe de base a été obtenu, généralement 7,4.

GOLD permet d'évaluer l'affinité d'un ligand vis à vis de son hôte à l'aide d'une fonction de score. Différentes fonctions de score sont possibles, nous avons privilégié l'usage de la fonction empirique CHEMPLP utilisé pour modéliser la complémentarité stérique entre la protéine et le ligand, tout en considérant des paramètres de distances et d'angles vis-à-vis des ponts salins et des ponts hydrogènes.

Des contraintes de docking peuvent être introduites pour biaiser le résultat et orienter le calcul. Quand les contraintes sont respectées, une contribution est ajoutée au score. Il peut par exemple s'agir de spécifier qu'un atome particulier de la protéine doit former un pont hydrogène avec les ligands, d'utiliser la conformation du ligand extrait comme gabarit en favorisant le recouvrement des atomes accepteurs et des atomes donneurs du ligand à docker sur ceux du ligand extrait ou encore de définir des motifs d'interaction.

Avant de lancer la procédure de calcul, la vitesse est définie à partir du nombre d'opérations successives permettant d'obtenir la flexibilité du ligand par algorithme génétique (de 10000 à 100000) pour chaque pose (c'est-à-dire toute conformation finale dockée d'un ligand) et du nombre de poses différentes pour chaque ligand. Lors de chaque session de calcul, le ligand extrait est le premier à être redocké afin de vérifier la validité des paramètres et contraintes et de disposer d'un score de référence.

A l'issue d'une session de calcul, les poses sont regroupées par clusters et les clusters de poses présentant les meilleurs scores sont analysés afin de détecter d'éventuels faux positifs.

III. Cadre de l'étude

Un modèle de complexe protéine–ligand a servi de base à l'ensemble des calculs.

Il s'agit de la structure cristallographique, disponible sur la PDB¹¹ sous la référence 1L5G, d'un complexe de la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec le ligand cyclique pentapeptidique Arg-Gly-Asp-{D-Phe}-{N-methyl-Val-} en présence d'ions manganèse.¹²

L'analyse de la structure permet tout d'abord la mise en évidence des interactions protéine–ligand indispensables à l'obtention d'une bonne affinité. Le logiciel LigX permet de les visualiser.

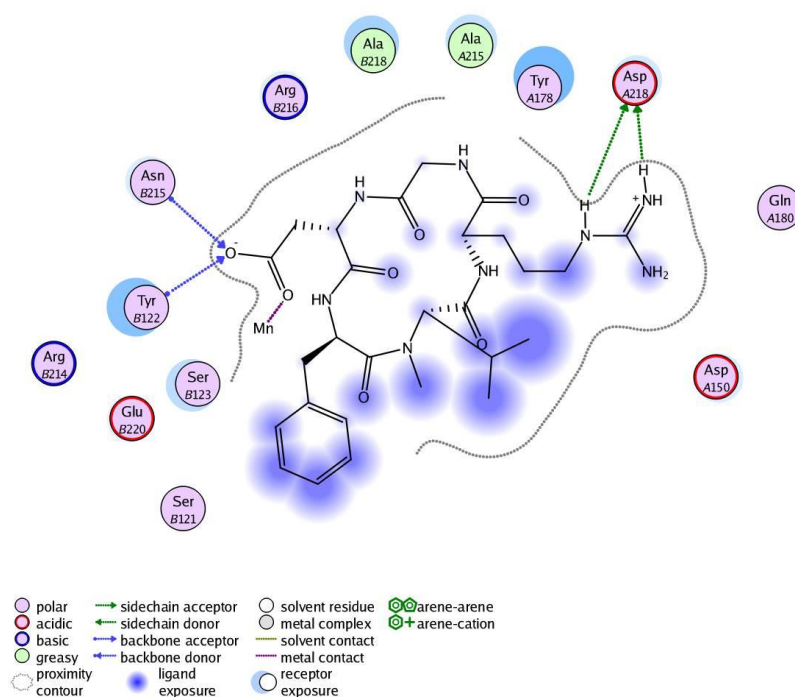


Figure 1 : Représentation LigX des principales interactions protéine-ligand dans le fichier PDB 1L5G.

Les principales interactions retenues pour la suite du travail sont les suivantes :

- Pont salin entre le cation métallique et le carboxylate de l'aspartate (residu D du cycloRGD)
- Pont hydrogène entre Asn B215 et Tyr B122 et le résidu aspartate D du cyclo RGD (accepteur)
- Pont hydrogène entre AspA218 et le résidu arginine R du cyclo RGD (donneur)

Les interactions hydrophobes mettant en jeu les groupements des résidus D-Phénylalanine et *N*-methyl Valine du cycloRGD ne sont pas prises en compte dans l'étape du design des peptidomimétiques.

Compte tenu de la structure du cycloRGD et de la nature des interactions mises en jeu lors de l'interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, différentes générations de peptidomimétiques, sur la base des variables et contraintes représentées Figure 36 (chapitre 2), ont été proposées et leur affinité vis-à-vis de l'intégrine a été évaluée *in silico* par docking. Les ligands dockés ne présentent pas le « linker » qui permet par la suite de se lier à la nanoparticule afin d'éviter les artefacts de calculs qui placerait cette partie du squelette en lieu et place des fonctions actives. Le calcul a été lancé sur la base de 50 poses pour chaque ligand avec la vitesse la plus lente, c'est-à-dire le maximum de variations conformationnelles.

Références Bibliographiques

1. F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. Williams, E. F. Meyer Jr, M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, and M. Tasumi, *J. Mol. Biol.*, 1977, **112**, 535–542.
2. J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, and M. A. Arnaout, *Science*, 2002, **296**, 151–155.

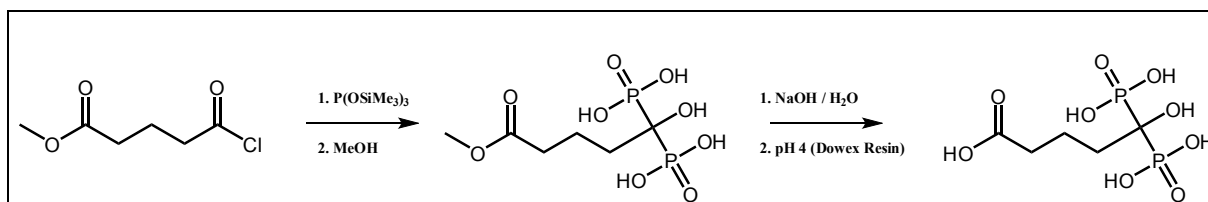
Annexe 5

Synthèse des HMBPs

Les spectres RMN du proton ^1H (400 MHz), du carbone ^{13}C (100.63 MHz) et du phosphore ^{31}P (161.98 MHz) sont enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance III 400. Les déplacements chimiques sont donnés en parti par million (ppm). Le pic du solvant a été utilisé comme référence (^1H NMR : CDCl_3 7.26 ppm, D_2O 4.79 ppm ; ^{13}C NMR : CDCl_3 77.2 ppm). Le spectre ^{31}P a été enregistré en prenant l'acide phosphorique comme référence externe. Les données sont reportées de cette manière : s = singulet ; d = doublet ; t = triplet ; q = quadruplet ; m = massif ; et les constantes de couplage sont données en Hz.

I. Synthèse du HMBP-COOH

Dans un tricol de 100 mL muni d'un thermomètre et d'une ampoule d'addition, un équivalent de méthyl 5-chloro-5-oxopentanoate (19,3 mmol) est introduit. Deux équivalents de tris(triméthylsilyl)phosphite (38,5 mmol) sont ensuite additionnés sous argon, à -20°C , goutte à goutte. Une fois l'addition terminée, le mélange réactionnel est laissé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 4h. L'évolution de la réaction est suivie par RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$. Les fractions sont ensuite évaporées sous pression réduite (0,1 Torr). Le mélange est hydrolysé dans du méthanol à température ambiante. Après évaporation, le résidu obtenu est basifié avec une solution de NaOH (1M) jusqu'à pH 12. Puis la solution est chauffée à 60°C pendant 4h. L'évolution de la réaction est suivie par RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$. Le produit est purifié par résine Dowex (pH=4,5). Après évaporation, le produit est lyophilisé. Une poudre blanche est obtenue.



Aspect : poudre blanche

Rdt : 82%

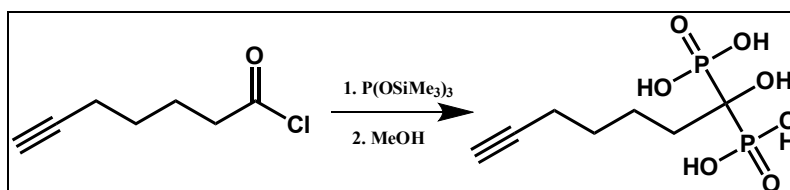
RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (161.98 MHz, D_2O) δ : 18.2 (s)

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ : 2,14 (t, $J^3(\text{H-H})=7.2$ Hz, 2H, CH_2COOH) ; 1,64-1,87 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + \text{CH}_2\text{COH}$)

RMN ^{13}C { ^1H } (100.63 MHz, D_2O) δ : 181.8 (COOH) ; 74,0 (t, $J^1(\text{P-C}) = 134,0$ Hz, COH) ; 36,8 (CH_2COOH) ; 33.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) ; 20.3 (CH_2COH)

II. Synthèse du HMBP- $\text{C}\equiv\text{CH}$

Dans un ballon de 100 mL, un équivalent de chlorure d'acyle 6-heptynoïque (19,3 mmol) est introduit. Deux équivalents de tris(triméthylsilyl)phosphite (38,5 mmol) sont ensuite additionnés, à -20°C . Une fois l'addition terminée, le mélange réactionnel est laissé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 4h. Les fractions sont ensuite évaporées sous pression réduite (0,1 Torr). Le mélange est hydrolysé dans du méthanol à température ambiante. Après évaporation, le produit est dissous dans l'eau à pH 2.3 et lyophilisé. Il est ensuite précipité dans un mélange eau/méthanol [1 :9]. Une poudre blanche est obtenue.



Aspect : poudre blanche

Rdt : 70%

RMN ^{31}P { ^1H } (161.98 MHz, D_2O) δ : 18.4 (s)

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 2.29 (t, $J^4(\text{H-H})=2.6$ Hz, 1H, $\text{HC}\equiv$) ; 2.20 (td, $J^3(\text{H-H})=7.2$ Hz, $J^4(\text{H-H})=2.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv$) ; 1.91 (m, 2H, CH_2COH) ; 1.63 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COH}$) ; 1.51 (qt, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COH}$).

RMN ^{13}C { ^1H } (100.63 MHz, D_2O) δ 86.5 ($\text{HC}\equiv\text{C-}$) ; 74.0 (t, $J^1(\text{P-C})=134.5$ Hz, COH) ; 68.9 ($\text{HC}\equiv\text{C-}$) ; 33.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COH}$) ; 28.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COH}$) ; 23.0 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv$) ; 17.5 (CH_2COH)

Annexe 6

Influence de la taille, de la forme, de la méthode de synthèse sur les propriétés des nanoparticules d'oxyde de fer

I. Protocole de synthèse des nanobâtonnets

Pour réaliser cette synthèse, une solution de 10 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.5 M) est mélangée avec 10 mL d'une solution d' HCl 0.04 M. 1 mL de dopamine est ensuite ajoutée au mélange réactionnel et mélangé à 500 rpm pendant 10 min. 180 mL d'eau à 80-90 °C sont ensuite versés. La solution est maintenue à cette température pendant 2 h sous reflux et agitation. La suspension est refroidie à température ambiante et le pH est ajusté à 7-8 à l'aide d'une solution de soude (1M). Le précipité est ensuite séparé par centrifugation et lavé avec de l'eau déionisée. La procédure de lavage est répétée plusieurs fois et le produit est dispersé dans l'eau à pH neutre. Une suspension colloïdale orange est obtenue.

2 mL de la solution de précurseurs ($[\text{Fe}] = 0.06 \text{ M}$) est mélangée avec 40 μL d'une solution aqueuse d'hydrazine ($3.9 \cdot 10^{-2} \text{ M}$). Le tube est ensuite placé dans le four à micro-onde. La suspension est chauffée jusqu'à 100°C avec une puissance de 200 W. Le produit noir obtenu est récupéré magnétiquement puis lavé avec de l'eau à pH 7.

II. Détermination du nombre d'acide caféique

Le nombre d'acide caféique par nanoparticule a été déterminé par analyse thermogravimétrique pour les nanoparticules sol-gel de 9 nm et les nanobâtonnets. Les courbes ATG obtenues sont présentées Figure 1 et Figure 2 respectivement.

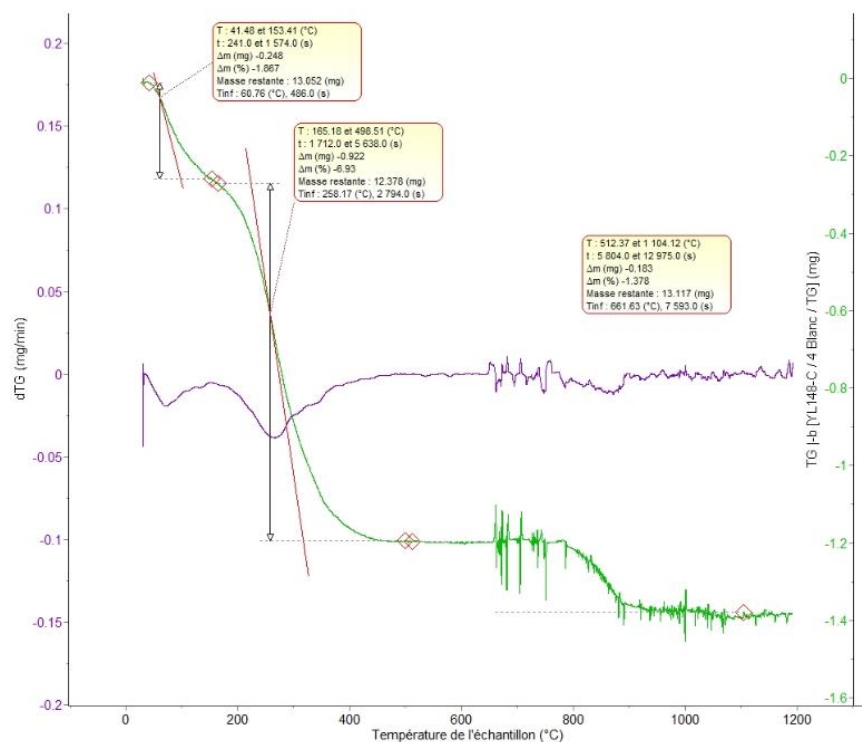


Figure 1 : Courbe ATG des nanoparticules sol gel 9 nm fonctionnalisées par l'acide caféique



Figure 2 : Courbe ATG des nanobâtonnets fonctionnalisés par l'acide caféique

III. Diffraction électronique

A titre d'exemple, le cliché de diffraction électronique, des nanoparticules de 4 nm sol-gel est présenté ci-dessous, Figure 3.

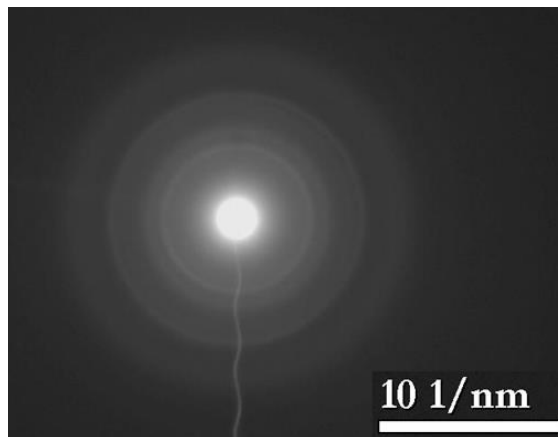


Figure 3 : Cliché de diffraction électronique des nanoparticules de 3.7 nm

La diffraction électronique permet de mettre en évidence la présence d'oxyde de fer de maghémite ou de magnétite dans les nanoparticules sol-gel synthétisées. Cependant, ces phases cristallines ne peuvent pas être différenciées par cette technique, Tableau 1.

Maghémite JCPDS N°00-025-1402		Magnétite JCPDS N°00-019-0629		3.7 nm
$d_{(3\ 1\ 1)}$	2.51 Å	$d_{(3\ 1\ 1)}$	2.53 Å	2.52 Å
$d_{(4\ 0\ 0)}$	2.08 Å	$d_{(4\ 0\ 0)}$	2.099 Å	2.00 Å
$d_{(4\ 4\ 0)}$	1.47 Å	$d_{(4\ 4\ 0)}$	1.48 Å	1.47 Å

Tableau 1 : Etude des clichés de diffraction électronique et interprétation des plans de diffraction par rapport aux références : maghémite et magnétite

Annexe 7

Manipulations biologiques – Protocoles expérimentaux

I. Ciblage des glioblastomes

I.1. Protocole

1/ Mise en contact avec un nodule 3D de cellules tumorales de type U87 d'agent de contraste fonctionnalisé (RGD) ou non fonctionnalisé. Pour cela, des nodules de 5 mm environ ont été incubés 24h dans un bain de milieu de culture contenant soit du milieu seul (condition Témoin), soit des nanoparticules non fonctionnalisées (100 µg/mL), soit des nanoparticules fonctionnalisées (100 µg/mL)

2/ À l'issue de cette incubation, les nodules sont rincés par changement du milieu par du milieu frais pendant 1h (1^{er} bain de rinçage), puis pendant 17h (2^{ème} bain de rinçage).

3/ Les nodules sont ensuite montés dans des tubes de culture contenant du Matrigel® (matrice extra-cellulaire permettant leur survie) pour les imager en IRM à 7 T.

I.2 Séquence IRM

Les fantômes sont scannés sur l'IRM 7T préclinique de Neurospin à l'aide de deux séquences dont les paramètres sont présentés ci-dessous. Ils sont maintenus à 37°C pendant toute la durée des acquisitions par une soufflerie d'air chaud.

Type de séquence	MSME	FISP
Carte paramétrique	T_2	T_1
TE (ms)	7,7	2,5
TR (ms)	10000	15000
Paramètre spécifique	64 échos	6 segments, 90 movies
Résolution dans le plan (mm)	0,25 x 0,25	0,25 x 0,25
Field Of View dans le plan (mm)	30 x 30	30 x 30
Epaisseur de coupe (mm)	1,25	1,25
Nombre de coupes	6	6
Durée d'acquisition (min)	80	54

Tableau 1 : Séquences IRM utilisées sur l'IRM 7T préclinique de Neurospin

II. Etude sur les cellules CT26

La lignée cellulaire CT26 provient de l'ATCC (American Type Culture Collection) (ATCC, CRL-2638, LGC Standards, Molsheim, France), et est cultivée à 37°C, dans une atmosphère humidifiée à 5% CO₂, dans le milieu (DMEM, Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal (FBS, Gibco Life technologies), 100 µL de streptomycine et 100 U/mL de pénicilline.

II. 1. Test de cytotoxicité au MTT

Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu-violet. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique.

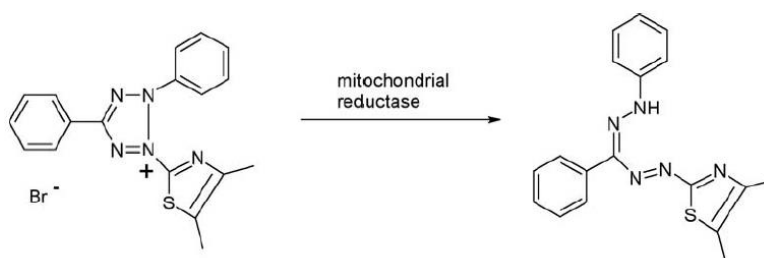


Figure 1 : Principe du test MTT : réduction de l'anneau tétrazolium par la succinate déshydrogénase mitochondriale en formazan

Jour1 : Ensemencement des cellules en plaques 96 Puits : Préparation de plaques 96 puits, 10 000 cellules CT 26 /puits (100 µl), incubation 24H à 37°C sous 5% de CO₂.

Jour2 t=0: Dépôts des produits : Préparation des différentes concentrations en produits à tester dans du milieu de culture et dépôt des produits. (témoin : solvant de l'échantillon considéré).

Jour2 t=24h: Test MTT : Préparation d'une solution de MTT dans du PBS à 5mg /ml, dilution au 1/10^{ème} de cette solution dans du milieu de culture. Ajout de 100µl /puits de MTT et incubation à 37°C 4H. Solubilisation des précipités par 100µl de tampon de lyse (10% HCl, 10% triton X100, Qsp 100mL pentan-2-ol) sous agitation, lecture de la DO à 562 nm.

II. 2. Internalisation – dosage du fer

Jour1 : Ensemencement des cellules en plaques 96 Puits : Préparation de plaques 96puits, 10 000 cellules CT 26 /puits (100 µl), incubation 24H à 37°C sous 5% de CO₂.

Jour2 : Dépôts des produits : Préparation des différentes concentrations en produits à tester dans du milieu de culture

Jour2 t=2h: Dosage du fer : Lavage des cellules avec 250µl de PBS (x2). Lyse des cellules par 100µl d'HCl 12N, ajout de 100µl d'eau distillée et lecture de l'absorbance à 340 et 480nm. Préparation d'une gamme de nanoparticules directement dans la plaque

II. 3. Marquage au bleu de prusse

Jour1 : Ensemencement des cellules en plaques 96 Puits : Préparation de plaques 96 puits, 10 000 cellules CT 26 /puits (100 µl), incubation 24H à 37°C sous 5% de CO₂.

Jour2 t=0: Dépôts des produits à une concentration en particules de 3.75 mM

Jour2 t=2h: Marquage au bleu de prusse : Préparation des solutions de Ferrocyanure à 5% dans de l'eau distillée et d'Acide chlorhydrique à 10% dans de l'eau distillée. Rincer les cellules 3x dans du PBS, et les fixer avec du paraformaldéhyde 5% 15min à 37°C. Laisser sécher à température ambiante pendant 12h. Ajouter le ferrocyanure pendant 15min à 37°C puis incuber 15 min à 37°C, ôter la solution puis ajouter le mélange volume à volume le ferrocyanure à 5% et d'acide chlorhydrique à 10%. Prendre des photographies des résultats obtenus.

II. 4. Implantation des tumeurs in vivo

Les études sont réalisées sur des souris femelles Balb/c (Janvier, St Genest de Lisle, France), âgées de 6 à 7 semaines. Les expériences sur les animaux ont été conduites selon les instructions européennes et nationales et ont été approuvées par un comité éthique institutionnel. (saisine CEEA34.JS.142.12)

L'implantation ectopique des tumeurs se déroule de la manière suivante. Une souris portant une tumeur CT26 sous cutanée est sacrifiée, la tumeur est réséquée, placée dans du milieu de culture DMEM et coupée en fragments de 20-30 mm³. Ces derniers contiennent approximativement 9.10⁵ cellules tumorales. Les fragments tumoraux sont transférés dans un tampon phosphate salin stérile et insérés en sous cutanée, en utilisant un trocart de gauge 12 (38 mm) dans le flanc de la souris, préalablement désinfecté à l'alcool.

II. 5. Imagerie IRM

Les expériences IRM ont été réalisées à 7 T sur un spectromètre doté d'un aimant 300WB ultra blindé équipé d'un système de micro IRM (Bruker , Avance II , Wissembourg , France) Celui-ci est équipé d'une bobine d'acquisition Bruker corps entier de diamètre intérieur 40mm diamètre intérieur de type cage d'oiseaux (Birdcage) dédié à la souris et est muni du logiciel d'acquisition Paravision 5.

Pour les expériences de relaxométrie en solution, des cartographies T1 et T2 ont été enregistrées (30min) sur 6 séries d'échantillons des nanoplateformes à concentration variables 1, 0,5, 0,2, 0,1, 0,05 mM en Fer, à 298K. Les séquences pour quantifier les valeurs de T1 : Séquence de saturation de type RARE (n=2) à Temps de répétition variables TR = 15s, 10s, 8s, 3s, 1,2s, 0,8s, 0,6s, 0,3s, 0,15s, 0,05s, FOV = 30mmx30mm, matrice 128x128,

Les séquences pour quantifier les valeurs de T2 : séquence multiécho de spins à TE variable : 32 valeurs de multiples de 11ms.

Pour les expériences in vivo, les études IRM ont été effectuées en accord avec les recommandations françaises pour la protection des animaux et dans le respect des procédures approuvées par les comités d'examen institutionnels appropriés. Un support supplémentaire a été utilisé pour le positionnement stéréotaxique de l'animal par la tête par un masque, apportant l'anesthésie volatile. Les souris ont été anesthésiées avec 1,5 % d'isoflurane (TEM, Bordeaux) dans un mélange d'oxygène et d'air (0,2 – 0,5 L.min⁻¹). La température de l'animal a été surveillée et contrôlée. La respiration a été suivie en utilisant un capteur en plastique située sur le thorax de la souris et la surveillance physiologique pour la synchronisation respiratoire (SA Instruments Inc.). Un tube d'eau de référence de 5 mm a été inséré parallèlement à la souris.

Les séquences utilisées sont des séquences pondérées T2* avec synchronisation respiratoire.

Le FOV = 30mmx30mm, matrice 256x256, TR = 350ms, TE = 5ms, 5 tranches, durée environ 6min.

Les expériences d'ICP AES ont été effectuées à l'ENSCP selon un protocole de solutions préparées en concentration de l'ordre du ppm et des gammes d'étalons de Fer à concentrations connus à partir d'échantillon étalon de référence ICP.

III. Ciblage des plaques d'athérome

Les plaques d'athérome (des coupes de section 7 à 10 μm) étant inclus dans de la paraffine sont préparées pour la coloration immuno-histochimique par déparaffinisation avec du xylène (2 fois 10min) suivi d'éthanol (5min à 100%, 5min à 95%, 5min à 80%) puis hydratation dans de l'eau.

Jour 1 : Incuber les coupes dans de l'eau (3% H_2O_2) pendant 15min. Laver les coupes avec du PBS 1X 0.025% Triton. Drainer les coupes quelques secondes avec du papier. Bloquer avec du PBS 1X-BSA 1%-0.2% Triton X-100 pendant 30 min. Drainer les coupes quelques secondes avec du papier. Appliquer la solution de nanoparticules. Incuber toute la nuit à 4°C dans une chambre humidifiée.

Jour 2 : Rincer 5 fois avec du PBS 1X 0.025% Triton et une fois avec du PBS 1X. Drainer les coupes quelques secondes avec du papier. Marquage au bleu de Prusse (voir paragraphe I.3)

L'imagerie de l'angiogénèse tumorale représente actuellement un domaine majeur de la recherche pour la détection précoce des cancers et le développement de nouveaux traitements des tumeurs. Les cellules endothéliales des néovaisseaux formés surexpriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui se lie sélectivement aux peptides contenant la séquence Arg-Gly-Asp (RGD). Le processus angiogénique joue également un rôle dans le développement d'autres pathologies telles les maladies cardiovasculaires. Le but de ce projet est ainsi de concevoir un agent de contraste bimodal (IRM et fluorescence) ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ pour une détection précoce de l'angiogénèse. Des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer ont été fonctionnalisées en surface par des agents complexants de type cathécol ou bisphosphonate présentant des fonctions réactives terminales, acide carboxylique ou alcyne. L'efficacité du couplage de diverses molécules (fluorophores, PEG, RGD) par chimie des carbodiimides ou par chimie click (réactions de Huisgen ou thiol-yne) a été comparée. La stabilité des différentes sondes dans le sérum et leur potentiel en tant qu'agent de contraste IRM a été évalué. L'affinité vis-à-vis des intégrines a été étudiée par résonance plasmonique de surface et par dosage de liaisons sur support solide en présence d'un compétiteur radioactif. Dans le but d'optimiser les propriétés d'agents de contraste IRM, une étude de l'influence de la taille et de la forme des nanoparticules a été réalisée. Les premières évaluations *in vitro* et *in vivo* des nanoplateformes ont été entreprises. Parallèlement, une nanoplateforme théranostique, alliant diagnostic et thérapie, a été envisagée.

Elaboration and Characterisation of MRI contrast agents targeting $\alpha_v\beta_3$ integrins

The molecular imaging of tumor angiogenesis currently represents a major field of research for the diagnostic and the development of new treatment strategy of solid tumors. Endothelial cells from tumor neovessels overexpress the $\alpha_v\beta_3$ integrins, which selectively bind to Arg-Gly-Asp (RGD)-containing peptides. The angiogenic process plays a key role during the development of other pathologies like cardiovascular diseases. So, the aim of this project is to design a bimodal contrast agent (MRI and fluorescence) targeting $\alpha_v\beta_3$ integrins for early angiogenesis detection. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles were surface functionalized with catechol and bisphosphonate as anchoring agents and bearing carboxylic acid or alkyne functions as terminal end groups. We compared the efficiency of conjugation of three different types of molecules (fluorophores, PEG and RGD peptides) using carbodiimide coupling and click chemistry (Huisgen and thio-yne reactions). The stability of the various nanoplatfroms and their uses as MRI contrast agents were evaluated. The affinity towards integrins was evidenced by surface plasmon resonance and solid-phase receptor-binding assay with a radioactive competitor ligand. With the aim to improve MRI properties, nanoparticles differing by their size and shape were synthesized and the magnetic properties were studied. The first *in vitro* and *in vivo* experiments were performed. In parallel, a theranostic nanoplatfrom, with both properties of diagnostic and therapy, has been considered.

CHIMIE

Nanoparticules d'oxyde de fer - Imagerie - IRM- Angiogenèse - Intégrines $\alpha_v\beta_3$ – RGD

Laboratoire CSPBAT – UMR 7244 CNRS – Université Paris 13